



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

RAQUEL BUENO BARBIERI BATISTA

ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DE GENES CONTROLADORES DO CICLO
CELULAR NO CARCINOMA MEDULAR DE TIREOIDE

GENE POLYMORPHISM ANALYSIS CELL CYCLE CONTROL IN MEDULLARY
THYROID CARCINOMA

CAMPINAS

2016

RAQUEL BUENO BARBIERI BATISTA

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DE GENES CONTROLADORES DO CICLO
CELULAR NO CARCINOMA MEDULAR DE TIREOIDE**

**GENE POLYMORPHISM ANALYSIS CELL CYCLE CONTROL IN MEDULLARY
THYROID CARCINOMA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências na Área
de Concentração em Clínica Médica.

*Thesis submitted to the State University of Campinas School of
Medical Sciences as part of the requirements for obtaining the title
Doctor in Sciences in the Concentration Area in Internal Medicine*

ORIENTADOR: Laura Sterian Ward

COORIENTADOR: Lígia Vera Montalli Assumpção

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA RAQUEL BUENO BARBIERI, E ORIENTADO PELA
PROF^a. DRa. LAURA STERIAN WARD

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

B234a Barbieri, Raquel Bueno, 1985-
Análise dos polimorfismos de genes controladores do ciclo celular no carcinoma medular de tireoide / Raquel Bueno Barbieri. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Laura Sterian Ward.
Coorientador: Lígia Vera Montalli Assumpção.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da glândula tireoide. 2. Ciclo celular. 3. Genes. I. Ward, Laura Sterian, 1956-. II. Assumpção, Lígia Vera Montalli. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Gene polymorphism analysis cell cycle control in medullary thyroid carcinoma

Palavras-chave em inglês:

Thyroid neoplasms

Cell cycle

Genes

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Laura Sterian Ward [Orientador]

Ivani Aparecida de Souza

Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti

Natassia Elena Bufalo

Alfio José Tincani

Data de defesa: 16-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RAQUEL BUENO BARBIERI BATISTA

ORIENTADOR: LAURA STERIAN WARD

COORIENTADOR: LÍGIA VERA MONTALLI ASSUMPÇÃO

MEMBROS:

1. PROF. DR. ADRIANA MADEIRA ÁLVARES DA SILVA CONFORTI

2. PROF. DR. IVANI APARECIDA DE SOUZA

3. PROF. DR. NATASSIA ELENA BUFALO

4. PROF. DR. ALFIO JOSE TINCANI

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA 16/02/2016

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, **Gilmar e Ana Rosa**, por sempre terem investido em mim e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história para que eu me tornasse quem sou hoje.

Ao meu marido **Paulo Cesar**, que me acompanhou e me ajudou em tudo e sempre acreditou em mim, pelo seu apoio, paciência e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de todas as coisas, pois Ele é a razão de tudo!

À minha orientadora, Profa. Dra. Laura Sterian Ward, agradeço por me permitir fazer parte de seu grupo de estudo, pelo tempo dedicado a mim, por sua disponibilidade, por todos os ensinamentos, apoio, incentivo e compreensão.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular do Câncer, aqueles que passaram por lá e deixaram grandes ensinamentos, e aqueles que ainda permanecem. Agradeço pelos bons momentos juntos e pela paciência.

À Dra. Lígia Vera Montalli Assumpção, minha co-orientadora e chefe do Ambulatório de Tumores da Tireoide do Hospital das Clínicas da UNICAMP, por seu apoio, sabedoria e grande colaboração. Sem sua participação e ajuda esta dissertação não seria possível.

A todos do Laboratório de Endocrinologia Molecular da UNIFESP, especialmente ao Dr. Rui Maciel e a Dra. Janete Cerutti pelos incentivos, críticas, sugestões e, principalmente, por abrir as portas de seu laboratório para que fizéssemos uma parceria essencial para que este estudo se desenvolvesse.

A todos os pacientes e voluntários que, doando um pouco de si, tiveram o desprendimento e a generosidade de, possivelmente, ajudar não a si mesmos, mas também a outros.

À Profa. Dra. Adriana Madeira, uma excelente professora e uma das responsáveis e incentivadoras à minha entrada no mundo da pesquisa e também por ter me dado a primeira oportunidade de estar em um laboratório de pesquisa. Por me dar exemplos de ética e dedicação ao trabalho. Suas palavras de carinho e incentivo são sempre lembradas!

A toda a minha família, que torceram por mim e, como grande família sempre esteve presente quando mais precisei.

À minha mãe, Ana Rosa, por ter se dedicado a vida toda ao meu crescimento, sonhado este sonho comigo e ter participado de todos os momentos. Pelos seus conselhos sempre fundamentais em minha formação como pessoa.

Ao meu pai, Gilmar, por sempre ter me incentivado com os estudos e ter sonhado com minha vida acadêmica, até mesmo antes de mim. Obrigada por ser meu exemplo e porto seguro.

À minha irmã, Laís, por compreender meus momentos de mau humor e ausência, e por tornar a minha vida mais divertida de ser vivida.

Ao meu marido, Paulo Cesar, por ter dividido este sonho comigo, por seu amor, carinho e paciência. Por sempre me ouvir, me encorajar e me mostrar que eu sou capaz de superar as dificuldades. Muito obrigada. Amo Você!

Aos meus avós, Zezinho e Nadir, que estiveram comigo em todos os momentos com grandes conselhos que me ajudaram a crescer. Por sempre orarem, torcerem e vibrarem por mim.

Aos meus professores e aos meus colegas do Centro Universitário Fundação Santo André - CUFSA, pelos cinco anos incríveis que vivemos durante as aulas da faculdade e por terem me incentivado a seguir em frente e me dado tanto apoio, conselhos e carinho quanto podiam. Se hoje cheguei até aqui, vocês também são responsáveis por isso. Obrigada!

Aos meus colegas, professores e demais funcionários da Escola Estadual Áurea Anunciação A. Godoi, que compartilham diariamente comigo as dores e as delícias dessa profissão, que sejamos sempre firmes e pacientes ao lecionar!

Aos meus queridos alunos, que me permitem compartilhar os conhecimentos adquiridos ao longo da vida. Nunca desistam!

À FAPESP e a CAPES, pois sem o apoio financeiro e a bolsa, este trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

Obrigada a todos!

*"Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui,
nunca desista de seus objetivos mesmo que pareçam impossíveis,
a próxima tentativa pode ser a vitoriosa"*

Albert Einstein

RESUMO

O câncer de tireoide representa cerca de 2% de todas as neoplasias humanas e a sua incidência está aumentando no mundo todo tendo dobrado nas últimas três décadas. No Brasil, há uma previsão de 6.960 novos casos em 2016, fazendo com que o câncer de tireoide atinja a oitava posição entre as neoplasias malignas mais frequentes na mulher. Os carcinomas medulares da tireoide derivam das células C ou parafoliculares, estes são responsáveis por menos de 3% dos carcinomas tireoidianos. O carcinoma medular é principalmente esporádico (70-80%), mas o padrão hereditário está presente em 20 a 30% dos casos. Devido a isso, nosso grupo vem se empenhando ativamente na busca tanto de marcadores de malignidade quanto de agressividade. Em especial, demonstramos que vários polimorfismos gênicos estão associados ao risco de câncer de tireoide. O ciclo celular representa uma série altamente regulada de eventos que levam à reprodução de células. A fase de progressão do ciclo celular é regulada principalmente por ciclinas, quinases dependentes de ciclina (CDK) e os inibidores de CDK (CDKIs). Ciclinas e CDKs formam complexos que regulam o crescimento celular pela marcação e fosforilação de uma proteína-alvo, enquanto CDKIs inibem a atividade dos complexos e induzem a parada do ciclo celular. Alterações genéticas na via envolvida na manutenção da integridade genômica são importantes contribuintes para a suscetibilidade ao câncer de tireoide. No entanto, a utilidade clínica potencial de CDKIs tem se mostrado bastante discutível. Este trabalho visa ampliar o conhecimento acerca da contribuição de polimorfismos genéticos em CDKIs no risco de câncer de tireoide e no processo de carcinogênese, buscando marcadores diagnósticos e prognósticos. Utilizando um grupo bem caracterizado de 138 pacientes com carcinoma medular hereditário, 45 carcinomas medulares esporádicos e 100 controles normais pareados, investigamos polimorfismos dos genes *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *CDKN2B* e *CDKN2C*. A identificação de um perfil de risco e de agressividade tumoral pode ajudar a delinear novas estratégias de prevenção, diagnóstico, planejamento terapêutico e seguimento dos pacientes com câncer medular de tireoide.

Palavras-Chave: Neoplasias da glândula tireoide, ciclo celular, genes.

ABSTRACT

Thyroid cancer accounts for about 2% of all human cancers and its incidence is increasing worldwide having doubled in the last three decades. In Brazil, 6,960 new cases were estimated to occur in 2016, making thyroid cancer the eighth most common malignancy among women. The medullary thyroid carcinomas derived from C or parafollicular cells, they account for less than 3% of thyroid carcinomas. Medullary carcinoma is sporadic primarily (70-80 %), but the inheritance pattern is present in 20 to 30% of cases. Because of that, our group has been working actively in the search for markers of malignancy and aggressiveness. In particular, we have shown that several genetic polymorphisms are associated with the risk of thyroid cancer. The cell cycle is a highly regulated series of successive events leading to cell reproduction. Cell cycle progression is mainly regulated by cyclins, cyclin-dependent kinases (CDK) and CDK inhibitors (CDKIs). Cyclins and CDKs form complexes that regulate cell growth by marking and phosphorylating protein targets, while CDKIs inhibit the activity of the complexes and induce cell cycle disruption. Changes in the genetic pathway involved in the maintenance of genomic integrity are important contributors to the susceptibility to thyroid cancer. However, the potential clinical utility of CDKIs remains controversial. This job aims to expand knowledge on the contribution of genetic polymorphisms on the risk of thyroid cancer and on the process of carcinogenesis, aiming to identify diagnostic and prognostic markers. Using of a very well characterized group of 138 patients with hereditary medullary thyroid carcinomas, 45 sporadic medullary thyroid carcinomas and 100 paired health controls, we will investigate polymorphisms of *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *CDKN2B* and *CDKN2C* genes. The identification of a profile of risk and thyroid cancer aggressiveness may help develop new strategies for the prevention, diagnosis, treatment planning and follow-up of patients with medullary thyroid cancer.

Keywords: Thyroid neoplasms, cell cycle, genes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estimativa do número de casos novos de câncer em homens para o ano de 2016 no Brasil, exceto pele não melanoma	18
Figura 2: Estimativa do número de casos novos de câncer em mulheres para o ano de 2016 no Brasil, exceto pele não melanoma	18
Figura 3: Representação da relação entre a mutação do gene <i>RET</i> e o fenótipo associado de acordo com as recomendações da <i>American Thyroid Association</i> (ATA). Adaptado de Kloos <i>et al.</i> , 2009	21
Figura 4: O Ciclo Celular. Esquema modificado de Goode, <i>E.L. et al</i>	24
Figura 5: Proteínas envolvidas na transição de G1 para S do ciclo celular. Esquema modificado de Sherr, <i>C.L. et al</i>	25
Figura 6: Coordenação das proteínas P16 e outros na modulação Fosforilação da pRb CDK4/6-mediated.....	30
Figura 7: Representação gráfica para o resultado de um indivíduo que apresenta o genótipo homozigoto selvagem	39
Figura 8: Representação gráfica para o resultado de um indivíduo que apresenta o genótipo homozigoto polimórfico.....	40
Figura 9: Representação gráfica para o resultado, onde as curvas indicam que o indivíduo apresenta o genótipo heterozigo	40
Figura 10: Em azul (losango), indica que as amostras são do alelo Y, ou seja, indica que são homozigotos selvagens; em verde (triângulo), as amostras são heterozigotas, em vermelho (círculo), as amostras são homozigotas e o quadrado indica o controle negativo	41

Figura 11: Representação gráfica da contribuição relativa dos genes <i>CDKN1B</i> e <i>CDKN2A</i> para o risco de carcinoma medular de tireoide esporádico de acordo com uma análise de regressão <i>stepwise</i>	47
Figura 14: Representação da ausência e presença da extensão extratireoidiana em pacientes com genótipo polimórfico e normal para o CMT-s	50
Figura 15: Representação da ausência e presença de metástase em pacientes com genótipo polimórfico e normal para o CMT-s	51
Figura 16: Representação do tamanho do tumor (cm) em pacientes com genótipo polimórfico e normal para o CMT-s	52
Figura 17: Comparação entre o tamanho do tumor primário e genotipagem do polimorfismo do gene <i>CDKN1B</i> em pacientes com carcinoma medular da tireoide hereditário (CMTH), através da análise de regressão logística multivariada	61
Figura 18: Comparação entre a idade de diagnóstico e genotipagem no gene <i>CDKN1B</i> de pacientes com carcinoma medular da tireoide hereditário (CMTH), através da análise de regressão logística multivariada	62

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Relação dos polimorfismos e registros de cada gene que foram analisados	38
Tabela 1 – Características clínicas dos pacientes com Carcinoma Medular da Tireoide Esporádico (CMT-s) em comparação com o grupo controle	43
Tabela 2: Comparação entre os perfis de genotipagem dos genes estudados de pacientes com carcinoma medular da tireoide esporádicos (CMT-s) e a população de controle, usando análise de regressão logística multivariada	44
Tabela 3: Comparação entre os perfis de genotipagem dos genes <i>CDKN1B</i> e <i>CDKN2A</i> de pacientes com carcinoma medular da tireoide esporádicos (CMT-s) e a população de controle, usando análise de regressão logística multivariada.....	46
Tabela 4: Resultados de todos os polimorfismos estudados, em comparação com os dados clínicos analisados. Apresentação de valores em porcentagem e mediana em relação ao genótipo de cada polimorfismo	48
Tabela 5: Resultados de todos os polimorfismos estudados, em comparação com os dados clínicos analisados. Os números em cada célula representam o valor p de coluna respectiva associado com a linha	50
Tabela 6: Resultados de todos os polimorfismos estudados, em comparação com os dados clínicos analisados dos pacientes com CMTH. Os números em cada célula representam o valor de p de coluna respectiva associado com a linha	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATA – Do inglês, *American Thyroid Association*

CDKIs - Inibidores de CDKs

CDKN1A – Do inglês, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*

CDKN1B – Do inglês, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)*

CDKN2A – Do inglês, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

CDKN2B – Do inglês, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*

CDKN2C – Do inglês, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C*

CDKN2D – Do inglês, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D*

CDKs - Quinases Dependentes de Ciclina

CT – Câncer de tireoide

CDT – Carcinoma Diferenciado de Tireoide

CMT – Carcinoma Medular de Tireoide

CMTH – Carcinoma Medular de Tireoide Hereditário

CMT-s – Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico

CPT – Carcinoma Papilífero de Tireoide

CFT – Carcinoma folicular da tireoide

DNA – Do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*

INK2 - Inibidores da quinase 2

INK4 - Inibidores da quinase 4

NEM – Neoplasia Endócrina Múltipla

PCR - Do inglês *Polymerase Chain Reaction*

Rb - Retinoblastoma

RET –, *REarranged during Transfection*

SNP – Do inglês, *Single Nucleotide Polimorphysm*

TNM – Tumor, Linfonodo e Metástase

TP53 – Do inglês, *Tumor Protein p53*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Câncer de Tireoide	17
1.2. O ciclo celular e os seus controladores	21
1.3. Importância dos genes de reparo e apoptose no câncer de tireoide	25
1.3.1. <i>P21 – CDKN1A</i>	26
1.3.2. <i>P27 – CDKN1B</i>	28
1.3.3. <i>P16 – CDKN2A</i>	29
1.3.4. <i>P15 – CDKN2B</i>	31
1.3.5. <i>P18 – CDKN2C</i>	32
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. METODOLOGIA	34
3.1. Sujeitos	34
3.2. Métodos	36
3.2.1. Extração de DNA de sangue periférico	36
3.2.2. Sequenciamento do gene <i>RET</i>	36
3.2.3. Identificação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes do ciclo celular	37
3.2.4. Análise Estatística	41
4. RESULTADOS	43
4.1. Pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico	43
4.2. Pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Hereditário	60

5. DISCUSSÃO	63
5.1. Pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Medular Esporádico	63
5.2. Pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Medular Hereditário	67
6. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Tireoide

O câncer de tireoide (CT) representa mais de 2% de todas as neoplasias humanas e a sua incidência está aumentando no mundo tendo dobrado nas últimas três décadas, principalmente por causa do carcinoma papilífero de tireoide (CPT), que é o tipo predominante dos tumores malignos da tireoide (1-2). A última estimativa mundial, realizada em 2012, apontou a ocorrência de cerca de 300 mil casos novos dessa neoplasia, sendo 86 mil no gênero masculino e 230 mil no gênero feminino (3).

Espera-se, para o ano de 2016, que o Brasil tenha 6.960 novos casos de CT, sendo 1.090 novos casos para o gênero masculino e 5.870 para o gênero feminino. Fazendo com que o CT ocupe a décima quarta posição entre os homens, sendo responsável por 0,5% de todos os cânceres no país como mostra a Figura 1. E da mesma forma, o CT ocupa a oitava posição, para as mulheres, responsável por 2,9% de todos os cânceres no país, como mostra a Figura 2 (3).

Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	61.200	28,6%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%
Cólon e Reto	16.660	7,8%
Estômago	12.920	6,0%
Cavidade Oral	11.140	5,2%
Esôfago	7.950	3,7%
Bexiga	7.200	3,4%
Laringe	6.360	3,0%
Leucemias	5.540	2,6%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%
Linfoma não Hodgkin	5.210	2,4%
Pele Melanoma	3.000	1,4%
Linfoma de Hodgkin	1.460	0,7%
Glândula Tireoide	1.090	0,5%
Todas as Neoplasias sem pele*	214.350	
Todas as Neoplasias	295.200	



Figura 1: Estimativa do número de casos novos de câncer em homens para o ano de 2016 no Brasil, exceto pele não melanoma (3).

Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	57.960	28,1%
Cólon e Reto	17.620	8,6%
Colo do útero	16.340	7,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Estômago	7.600	3,7%
Corpo do útero	6.950	3,4%
Ovário	6.150	3,0%
Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%
Leucemias	4.530	2,2%
Cavidade Oral	4.350	2,1%
Esôfago	2.860	1,4%
Pele Melanoma	2.670	1,3%
Bexiga	2.470	1,2%
Linfoma de Hodgkin	1.010	0,5%
Laringe	990	0,5%
Todas as Neoplasias sem pele*	205.960	
Todas as Neoplasias	300.870	



Figura 2: Estimativa do número de casos novos de câncer em mulheres para o ano de 2016 no Brasil, exceto pele não melanoma (3).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CT, em homens, é o 13º mais incidente na região Nordeste. Nas regiões Sul, Centro-Oeste, Norte e Sudeste ocupa a 14º posição. Nas mulheres, é o sexto mais frequente nas regiões Nordeste e Norte, mas nas regiões Sudeste e Centro-Oeste é o nono mais frequente, e na região Sul ocupa a 13º posição (3).

Os carcinomas diferenciados da tireoide (CDT) são derivados das células foliculares e subdivididos em dois grupos: CPT e foliculares (CFT). Os CPTs representam 80% de todos os tipos de CT e têm uma taxa de cura de 70 a 90%, enquanto 20% apresentam recorrência local e 5 a 10% podem desenvolver metástases à distância. Cerca de 5 a 13% são representados pelos CFT (4).

O principal fator de risco para o CDT, epidemiológica e experimentalmente bem estabelecido, é a exposição à radiação ionizante; embora existam outros fatores relacionados ao aumento de risco, incluindo o excesso de ingestão de iodo, doença nodular benigna prévia, produtos químicos, histórico familiar e exposição a vírus e bactérias (5-6). A citologia é um bom marcador de diagnóstico, no entanto, cerca de um terço dos casos não permitem diagnóstico citológico exato, levando à cirurgia um grupo considerável de portadores de nódulos que terminam se mostrando benignos ao exame histológico (7).

Os carcinomas indiferenciados ou anaplásicos constituem menos de 2% dos carcinomas tireoidianos e são altamente letais (8).

Existem ainda os carcinomas medulares da tireoide (CMT), que derivam das células C ou parafoliculares, estes são responsáveis por menos de 3% dos CT

(8). O CMT é principalmente esporádico (70-80%), mas o padrão hereditário está presente em 20 a 30% dos casos e é transmitido como um traço autossômico dominante. A forma esporádica do CMT (CMT-s) é observada em pacientes com idade entre 60 a 70 anos (9). Metástases linfonodais são detectadas em mais de 50% dos pacientes e metástases à distância como, por exemplo, no fígado, pulmões ou ossos, estão presentes em 10 a 20% dos casos (9).

O CMT tem sido diagnosticado com frequência progressivamente maior, principalmente a sua forma hereditária, graças aos métodos de rastreamento entre familiares de indivíduos afetados. Assim, a forma hereditária pode chegar a 25% dos casos. O CMT hereditário parece apresentar prognóstico um pouco mais favorável do que o esporádico, exceto aquele associado a NEM 2B, de comportamento altamente agressivo (10).

A identificação de mutações germinativas no gene *RET* (*REarranged during Transfection*) diferencia o CMT-s da forma hereditária ou familiar da doença (11-12).

O gene *RET* codifica um receptor de transmembrana e está envolvido na regulação, sobrevivência, diferenciação e migração das células derivadas da crista neural; está localizado no cromossomo 10q11.2, contém 21 exons que ocupam mais de 60kb do DNA genômico e é transcrito em pelo menos 10 isoformas alternativas da família das tirosino-quinases (13-14).

A identificação de mutações germinativas é de extrema relevância clínica, pois elas guardam estreita correlação com o fenótipo que determinam. Devido às

diferenças apresentadas entre elas em termos de prognóstico, a conduta cirúrgica, a necessidade de um rastreamento familiar, o aconselhamento genético e o tipo de seguimento das formas hereditárias, dependem da mutação detectada. A correta identificação dos fatores prognósticos, com a determinação do grau de agressividade do CMT em cada caso, pode ser útil para escolha de melhor estratégia na intervenção cirúrgica (15).

A Figura 3 resume a relação entre a mutação genética no gene *RET* e a apresentação clínica do paciente.

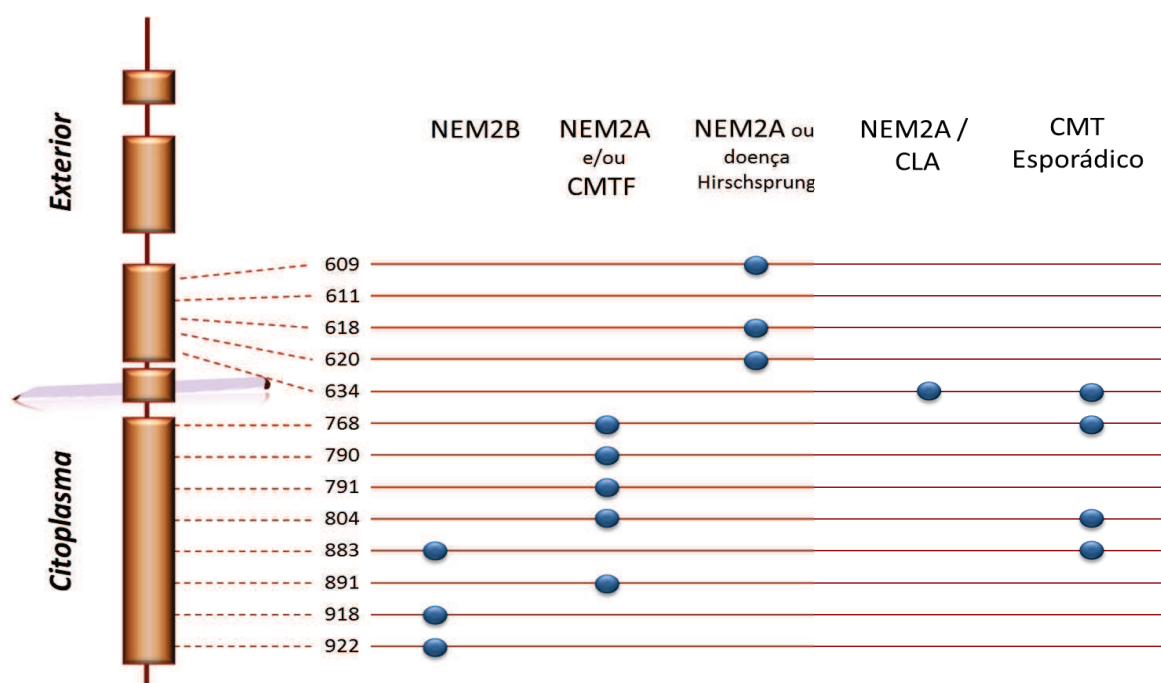


Figura 3: Representação da relação entre a mutação do gene *RET* e o fenótipo associado de acordo com as recomendações da *American Thyroid Association* (ATA) (15). Adaptado de Kloos *et al.*, 2009

Entretanto, a variabilidade na apresentação clínica do CMT não está relacionada apenas às mutações específicas, mas também a presença de polimorfismos no gene *RET* (16-17).

Sabemos que todos os casos de CMT merecem intervenção, e determinar qual a extensão desta intervenção é um dos principais desafios clínicos atuais. Por isso, se faz necessária a busca de novos marcadores de diagnóstico e de prognóstico (16).

Nosso grupo vem se empenhando ativamente na busca tanto de marcadores de malignidade quanto de agressividade (18-24). Em especial, demonstramos que vários polimorfismos estão associados ao risco de CT. Polimorfismos em genes que afetam vias fisiológicas, podem influenciar no desenvolvimento do CT (19, 21-26).

1.2. O ciclo celular e os seus controladores

O ciclo celular representa uma série altamente regulada de eventos que leva à reprodução de células eucarióticas. No início do ciclo, o DNA é replicado e os cromossomos são duplicados no decorrer da fase S. Este processo começa em locais específicos do DNA, chamados de origem de replicação. Nesses locais, durante a replicação do DNA, a dupla fita do mesmo é aberta expondo-o para as enzimas que realizam a síntese (27).

A fase S é seguida por segregação cromossômica, à divisão nuclear e celular, que é chamada de fase M. Entre as fases S e M ocorrem ciclos adicionais, que fornecem tempo para o crescimento e também servem como importante regulador de transições, e desta forma a progressão para a próxima fase do ciclo celular pode ser controlada por sinais intracelulares e extracelulares (28-29).

O período de G1 é uma regulamentação particularmente importante, porque neste período a maioria das células tornam-se engajadas em continuar a divisão ou saírem do ciclo celular (30-31). Na presença de condições desfavoráveis ou sinais inibitórios, as células podem retirar-se do ciclo celular entrando então no período de repouso (G0), uma característica da maioria das células funcionalmente diferenciadas do corpo humano (32-33) (Figura 3).

Cânceres são induzidos pelo crescimento celular descontrolado. O destino da célula é controlado estritamente por um conjunto de fatores do ciclo celular. Em particular, a proteína quinase CDK4 é importante para progressão do ciclo celular na fase G1 (28). CDK4 é responsável pela fosforilação do gene retinoblastoma Rb, um regulador negativo do ciclo celular e os primeiros identificados como supressores tumorais. A forma ativa de Rb se liga ao fator de transcrição E2F1 e também estabiliza heterocromatina constitutiva para manter a estrutura da cromatina (34).

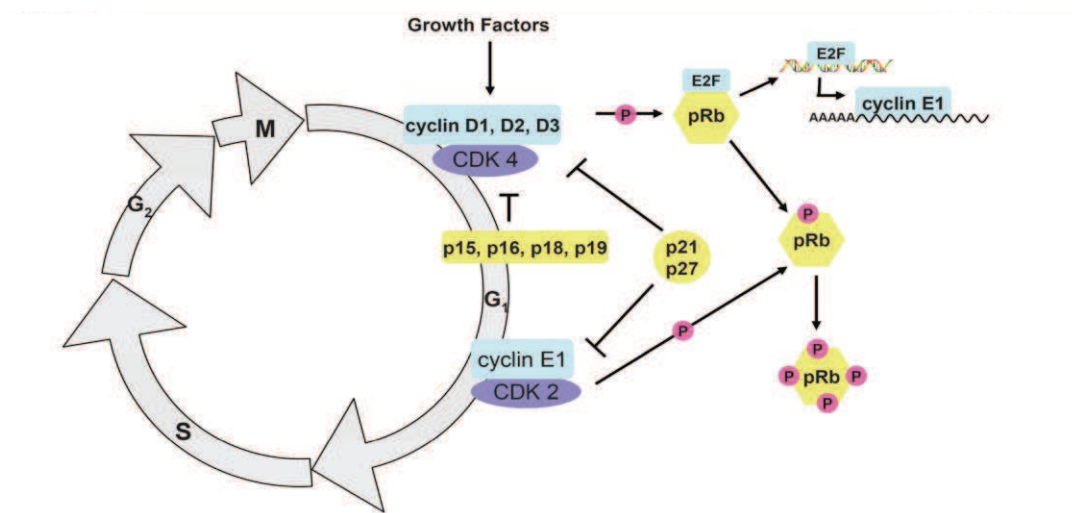


Figura 4: O Ciclo Celular. Esquema modificado de *Goode, E.L. et al* (35).

A fase de progressão do ciclo celular é regulada principalmente por proteínas como as ciclinas, as quinases dependentes de ciclina (CDKs), e os inibidores de CDKs (CDKIs) (36). Ciclinas e CDKs formam complexos que regulam o crescimento celular pela marcação e fosforilação de uma proteína-alvo, enquanto CDKIs inibem a atividade dos complexos e induzem a parada do ciclo celular (37-38).

CDKIs são classificados em dois grupos: o primeiro grupo é conhecido como inibidores da quinase 2 (INK2): *CDKN1A* e *CDKN1B*, que se ligam aos complexos ciclinas/CDK para impedir a transição da fase S do ciclo celular (39). O segundo grupo é conhecido como inibidores da quinase 4 (INK4), que inclui *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C* e *CDKN2D* que se ligam à CDK4 e CDK6 para impedir a sua associação com a ciclina D durante a progressão do ciclo celular na fase G₁ (Figura 5) (34).

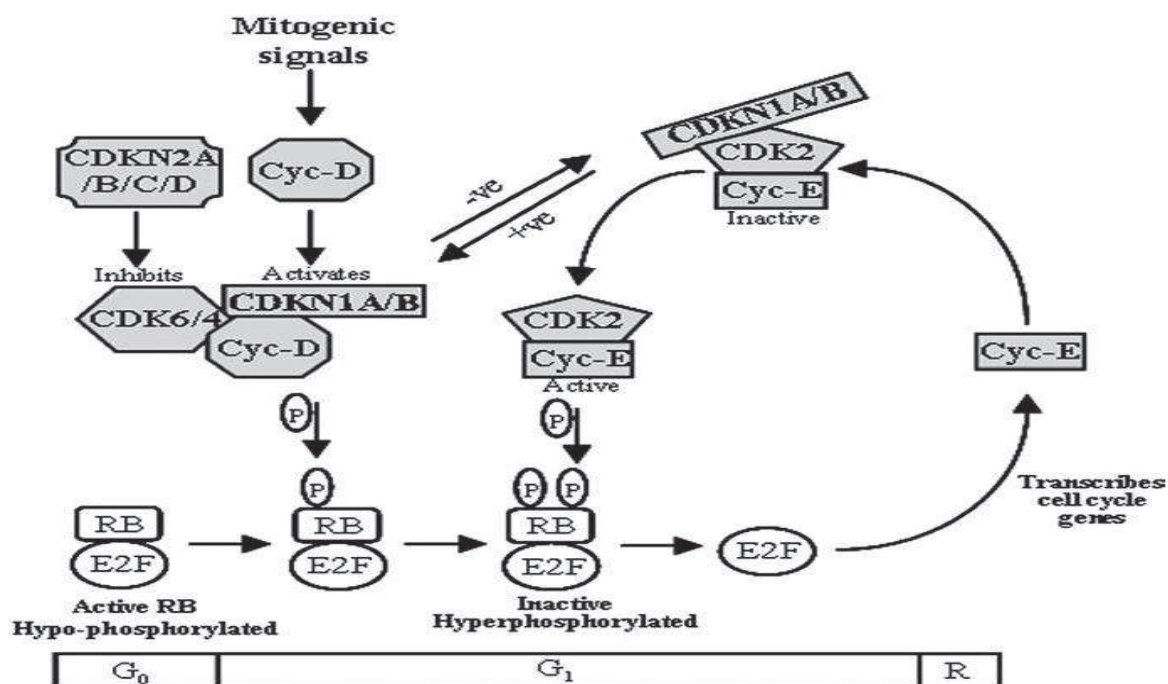


Figura 5: Proteínas envolvidas na transição de G1 para S do ciclo celular. Esquema modificado de Sherr, C.L. *et al* (39).

1.3. Importância dos genes de reparo e apoptose no câncer da tireoide

O ciclo celular regula o crescimento e diferenciação por isso, defeitos no controle do ciclo celular são uma marca registrada no desenvolvimento do câncer. A carcinogênese é um processo multifatorial onde células normais são sequencialmente transformadas pela ativação de proto-oncogenes e possível inativação de genes supressores de tumor em seu derivado maligno (40-42). Falhas nos genes do reparo do DNA e a consequente proliferação descontrolada

de células com danos em seu material genético contribuem para a formação de uma célula maligna (40, 43). O ciclo celular tem sido extensivamente analisado e diversos estudos sugerem que alterações genéticas da via envolvida na manutenção da integridade genômica são importantes contribuintes para a suscetibilidade ao CT (44). No entanto, a utilidade potencial de CDKIs numa vasta gama de tumores humanos tem se mostrado bastante discutível (45).

1.3.1 *P21 - CDKN1A*

O gene *P21* (*Cdkn1a/Waf1/Cip1*) é conhecido também como *CDKN1A* e está localizado no cromossomo 6p21.2. Estudos têm demonstrado que a expressão de *CDKN1A* é diretamente regulada por p53 em resposta ao dano no DNA, levando à parada do ciclo celular entre G1/S originando um ponto de checagem (46). Como p21 inibe a proliferação e atua como um dos alvos principais de transcrição, foi inicialmente considerada como um supressor tumoral. No entanto, os estudos também informam que este gene poderia agir como um oncogene por causa de suas atividades antiapoptóticas (47-48). Alterações em sua expressão têm sido observadas em uma ampla variedade de cânceres, incluindo câncer de mama, pulmão, colo do útero, ovário, fígado, útero e cânceres de cabeça e pescoço (47-48), indicando a importância deste na carcinogênese. Embora a relação deste gene com um tumor em formação seja evidente, as mutações são muito raras (49-50). Assim, a maioria dos relatos se concentram em alterações genéticas, e os genótipos de alguns polimorfismos funcionais têm se mostrado associada a um risco elevado de diferentes tipos de cânceres (51-52).

A perda da expressão ou da função de P21 tem sido implicado na carcinogênese e no prognóstico de múltiplos cânceres. No entanto, os estudos também sugerem que estes pode promover o desenvolvimento do câncer, indicando um efeito de mão dupla mostrando propriedades de supressão e progressão tumoral (51-52).

O gene *CDKN1A* possui diversos polimorfismos descritos e dentre eles o mais investigado é o Ser31Arg (rs1801270 C>A), com a troca do aminoácido Serina para Arginina no códon 31 causando uma perda do sítio de restrição e afetando a construção do DNA (53). Por isso, é provável que este polimorfismo resulte na alteração da expressão e/ou atividade, afetando a suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer (53). Muitos estudos moleculares têm sido conduzidos para avaliar o efeito do polimorfismo Ser31Arg e a sua relação no risco de desenvolvimento cancerígeno (35, 50).

Outro polimorfismo conhecido é o rs1059234 que leva a uma alteração de nucleotídeos C por T de parada na região 3' não traduzida. Estudos sugerem que a herança do alelo alterado C do SNP rs1059234 pode influenciar no desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres (51, 54-55). Os mecanismos que envolvem o efeito prejudicial da herança do alelo alterado neste polimorfismo ainda são desconhecidos. Há hipóteses de que uma mudança de nucleotídeos em UTR 3' pode afetar a estabilidade do mRNA. Essas possibilidades ainda precisam ser testadas em estudos futuros (56).

Podemos verificar também a existência do polimorfismo rs3176336 localizado no cromossomo 6, onde ocorre a troca de uma timina por uma adenina.

O alelo alterado deste SNP possibilita adicionar sítios de ligação para um ou mais reguladores de splicing intrônicos. Esta adição de splicing alternativo causada pela timina, pode modificar a estrutura do mRNAs e suas proteínas codificadas, resultando em alteração na função, incluindo a localização, ligação, estabilidade e fosforilação. Este polimorfismo tem sido associado ao desenvolvimento do câncer de mama (57-58).

1.3.2 *P27 - CDKN1B*

O gene *CDKN1B* é um inibidor do complexo ciclina/CDK (59), essencial para a progressão do ciclo celular. A perda de sua expressão o classifica como supressor tumoral, mas isso ainda permanece controverso uma vez que o gene raramente se encontra alterado em câncer (60-61).

CDKN1B localizado no cromossomo 12p13.1 desempenha um papel fundamental na etiologia do câncer tireoideano. Diversas evidências clínicas e estudos *in vitro* demonstram que a perda ou falta de expressão de *p27* podem contribuir para o processo de carcinogênese da tireoide (62-66). O -79C>T (rs34330) é um polimorfismo da região não traduzida 5' (5'UTR) e está relacionado à atividade do promotor (62, 65-66). Este polimorfismo pode estar associado com a suscetibilidade de desenvolvimento de CPT variante folicular (64).

Enquanto que a presença de outro polimorfismo rs2066827, o (326T>G V109G), também tem sido associado com a suscetibilidade ao câncer (67-69). A presença deste polimorfismo foi associada a uma maior agressividade ao CMT-s,

sugerindo um papel adicional para genes de baixa penetrância no prognóstico de pacientes com CMT (70).

1.3.3 *P16* - *CDKN2A*

O gene *CDKN2A* localizado no cromossomo 9p21.3 codifica o regulador do ciclo celular (Figura 6) e é considerado um dos principais genes envolvidos na suscetibilidade a melanomas malignos. Alterações neste gene foram observadas em tecidos de câncer folicular e anaplásico da tireoide , mas não em CDT (71).

O gene *p16*, também é considerado um supressor tumoral, desempenha um papel fundamental na regulação do ciclo celular causando um ponto de chegada entre G1/S. Possui a capacidade de se ligar com CDK04 e CDK06 impedindo a ligação destes com a proteína ciclina D e bloqueando a formação do complexo ciclina-CDK, impedindo assim a progressão do ciclo celular (72). Isto leva ao acúmulo de Rb e supressão do crescimento em G1 (73). Mutações germinativas no gene *p16* são conhecidas por predispor ao câncer de pâncreas e melanoma (74).

Foi demonstrado que a disfunção das proteínas envolvidas na via p16 pode promover um crescimento celular descontrolado, levando ao aumento da agressividade das células tumorais, como já descrito com melanoma e câncer de pulmão (75-77).

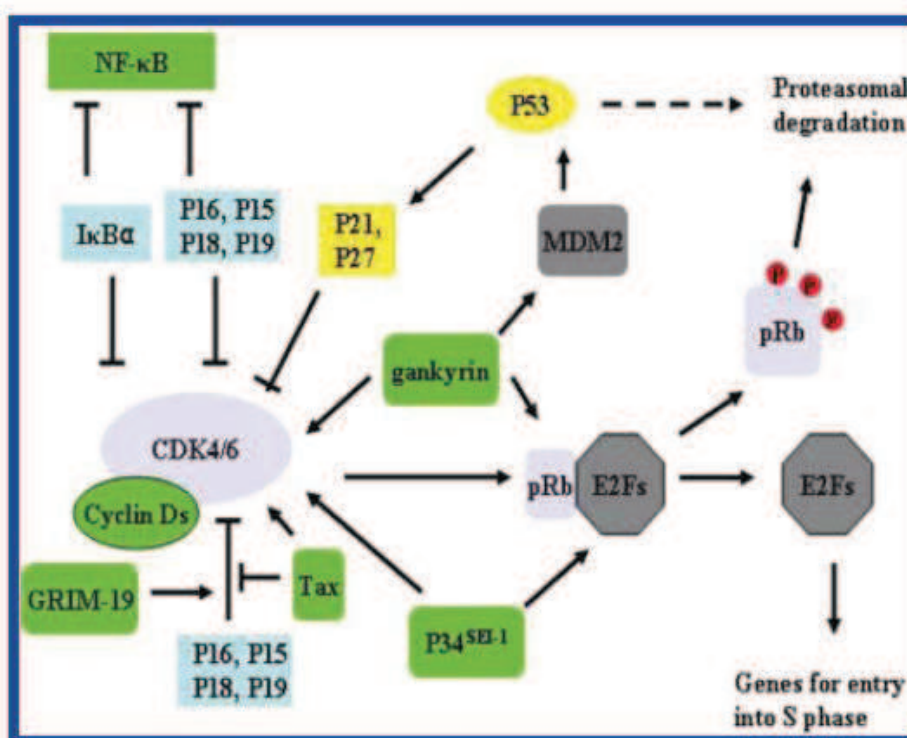


Figura 6: Coordenação das proteínas P16 e outros na modulação Fosforilação da pRb CDK4/6-mediated. Setas e as barras representam regulação positiva e negativa, respectivamente. Linhas pontilhadas denotam DNA genômico; P denota fosforilada. (78).

Dois polimorfismos existentes no gene *p16* (rs 11515 -C500G e rs 3088440 -C580T), localizados na região não traduzida do éxon 3 estão associados com tempo de evolução significativamente mais curto do tumor primário para o metastático (79). Essas descobertas são consistentes com um estudo atual, onde demonstra que os genótipos polimórficos de C580T (rs3088440) foram associados

com o tempo significativamente menor para progressão de tumor de melanoma e pior resposta à terapia (80).

O polimorfismo mais frequente em *CDKN2A*, é uma substituição de uma citosina por uma guanina na 3' UTR (rs11515), e está associado a diferentes tipos de câncer. O alelo G teve um aumento na frequência em famílias com melanoma, e em pacientes com psoríase e carcinoma de células escamosas (81-82). Este polimorfismo possui predisposição para afetar o micro RNA de ligação, e o alelo G está associado com aumento da expressão de *CDKN2A* e também com a expressão reduzida de *CDKN2B* (83-84).

1.3.4 P15 - *CDKN2B*

CDKN2B é um gene em estreita proximidade com *CDKN2A*, localizado em 9p21, considerado um supressor de tumor (83). *CDKN2B*, é um inibidor de CDK, que forma um complexo com CDK4 ou CDK6 e impede a ativação de CDK, assim, as funções da proteína codificada agem como um regulador de crescimento celular que controla a progressão do ciclo celular em G1 (85).

O gene *CDKN2B* consiste em dois exons de codificação. O SNP rs1063192 está localizado na região 3'UTR onde ocorre a troca de A por G. O significado funcional de rs1063192 ainda é desconhecido, no entanto estudos sugerem que a região 3'UTR pode ser importante em carregar informações de regulação (86). A 3'UTR é conhecida por ser importante para controlar a expressão do gene por meio de vários mecanismos, incluindo a exportação nuclear, poliadenilação, a

eficiência de tradução e a degradação do mRNA (87-88). É possível que o alelo G, considerado como alelo de risco do SNP, possa alterar um elemento regulador afetando a expressão de CDKN2B.

Um outro SNP também de interesse na região de *CDKN2A-CDKN1B* é o rs3731239 (A148G) responsável pela troca de A por G e está localizado no íntron 1 (89). Estudos recentes têm sugerido que a região 9p21.3, onde se encontra este polimorfismo, é rica em sequências reguladoras podendo estabelecer uma ligação entre polimorfismos presente nesta região e alterações em vias de sinalização (90). Este polimorfismo tem se associado com diminuição do risco de câncer de mama (91). Da mesma forma, outro polimorfismo descrito é o polimorfismo rs2069426 onde ocorre a troca do G por A na região intrônica e está associado com doença de Alzheimer (92).

1.3.5 *P18 -CDKN2C*

O gene *p18* é altamente expresso durante o desenvolvimento do organismo humano e sua perda de função está associada a alterações específicas que afetam a função do gene e podem predispor ao desenvolvimento de diferentes tipos de tumores (93); este gene pode ter uma função de supressão tumoral (94). O papel de alterações nestes genes tem sido estudado em alguns tumores endócrinos esporádicos, mas ainda pouco se sabe sobre seu envolvimento com o surgimento de tumores da tireoide (95). O polimorfismo rs12885 causa a troca de um G por T e está localizado na região intrônica, a sua presença pode interferir na expressão da proteína (93, 95).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a presença de polimorfismos em genes controladores do ciclo celular e verificar se estão associados à suscetibilidade e a agressividade do Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico e Hereditário.

2.2 Objetivos Específicos

Responder as seguintes perguntas:

- Polimorfismos nos genes *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *CDKN2B* e *CDKN2C* podem influenciar a suscetibilidade ao desenvolvimento do carcinoma medular da tireoide esporádico ou hereditário?
- Há uma associação entre a presença de polimorfismos dos genes *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *CDKN2B* e *CDKN2C* e fatores clínico-patológicos do carcinoma medular da tireoide esporádico ou hereditário?

3. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Câncer (GEMOCA) da Universidade Estadual de Campinas, sob a coordenação da Prof. Dra. Laura Sterian Ward em colaboração com a equipe do Laboratório de Endocrinologia Molecular e da Disciplina de Endocrinologia da UNIFESP, coordenada pelo Prof. Dr. Rui Monteiro de Barros Maciel e também com o Laboratório de Bases Genéticas dos Tumores da Tireoide, coordenado pela Professora Dra. Janete Cerutti. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP nº 1088/2011 (ANEXO 1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP nº 1749/06 (ANEXO 2).

Os pacientes foram selecionados no serviço de Câncer de Tireoide da Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica da FCM-Unicamp, sob a direção da Prof^a. Dra. Lígia Vera Montalli Assumpção que tem pacientes em seguimento há mais de 30 anos usando um protocolo padrão (15, 96-97) e também no Ambulatório de Carcinoma Medular da UNIFESP.

3.1. Sujeitos

Foram analisados 138 pacientes com carcinoma medular hereditário da tireoide (CMTH), 45 pacientes com câncer medular esporádico da tireoide (CMT-s), previamente genotipados para o gene *RET* e um grupo de 100 controles, todos pareados para sexo e idade.

Critérios de Inclusão: indivíduos que possuíam dados de identificação, idade ao diagnóstico, sexo, etnia, dados clínicos pré-cirúrgicos, exames realizados (ultrassom, de punção aspirativa por agulha fina com exame citológico, dosagem de calcitonina e entre outros), dados referentes à cirurgia e do exame anatomopatológico (medida do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação e presença de linfonodos metastáticos). Em relação aos pacientes com CMT-s, foram incluídos apenas aqueles que tiveram resultados negativo para mutações no gene *RET*. O período de seguimento mínimo foi de 12 meses.

Critérios de Exclusão: foram excluídos os indivíduos que possuíam antecedentes de outras malignidades ou de doença tireoidiana prévia, aqueles expostos a fatores específicos de risco laboral ou recreativo (como indivíduos expostos a radiação ionizante). Foram excluídos também os indivíduos que não apresentaram dados de concentração de calcitonina ou possuíam seguimento inferior a 12 meses após a cirurgia. Em relação aos pacientes com CMT-s e CMTH, foram excluídos aqueles que não possuíam resultados de sequenciamento para o gene *RET*.

Os indivíduos do grupo controle foram selecionados no Hemocentro de Campinas/UNICAMP, sob a direção de Marcelo Addas Carvalho. A amostra de sangue dos mesmos foi coletada no momento em que foram doar sangue, de modo a não sofrerem nenhum incômodo. Foram excluídos aqueles indivíduos que possuíam histórico de doenças tireoidianas e/ou algum parente de primeiro grau com histórico de doenças tireoidianas, além de indivíduos menores de idade e gestantes.

Todos os participantes deste estudo retrospectivo do tipo caso-controle foram devidamente informados dos objetivos da investigação e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme as determinações do Comitê de Ética em Pesquisa – FCM/UNICAMP e UNIFESP (ANEXO 3 a 5).

3.2. Métodos

3.2.1 Extração de DNA de sangue periférico

As extrações de DNA de sangue periférico coletado dos pacientes e controles foram realizadas pelo método de fenol-clorofórmio e armazenadas em freezer -20°C. Para verificar a pureza do DNA e a qualidade da extração, foram quantificadas por espectrofotometria utilizando o aparelho Picodrop (Picodrop Limited, Hinxton, United Kingdom).

3.2.2 Sequenciamento do gene *RET*

Anteriormente à análise da presença/ausência dos polimorfismos dos genes do ciclo celular, o grupo de pacientes com CMT foi submetido ao sequenciamento direto para os éxons 8, 10, 11, 13, 14, 15 e 16 do gene *RET*, usando Big Dye Terminator Cycle Sequencing™ Ready Reaction Kit (Applied Biosystems/ThermoFisher, Foster City, USA), conforme descrito por Nakabashi *et al.* (98).

3.2.3 Identificação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes do ciclo celular

Para a identificação do perfil genético dos pacientes utilizou-se a técnica de genotipagem pela reação de tempo real com sistema TaqMan (TaqMan® SNP Genotyping, ThermoFisher, Foster City, USA). Esta técnica tem como base a estabilidade térmica do DNA de dupla fita. Em condições de alta estringência, essa estabilidade é suficiente para distinguir o DNA-alvo entre pares de sonda. A hibridação só acontece se ocorrer pareamento perfeito entre sonda e DNA-alvo. Assim, podem ser construídas sondas específicas para cada alelo. O ensaio para genotipagem TaqMan® SNP Genotyping constitui uma combinação da hibridação e da atividade exonucleásica 5' da DNA-polimerase, acoplada à detecção de fluorescência (99).

Diluiu-se o DNA em uma concentração igual à de 10ng/μl. As genotipagens para os polimorfismos descritas no Quadro 1, dos genes *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *CDKN2B* e *CDKN2C* foram realizadas em placas específicas para o equipamento 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems/ThermoFisher, Foster City, USA). Para evitar resultados falso-positivos foi utilizada água ao invés de DNA como controle negativo na reação.

Gene	rs	Registro Applied
<i>P27 - CDKN1B</i>	2066827	C_11916245_10
	34330	C_2402292_10
<i>P21 - CDKN1A</i>	1801270	C_14977_20
	1059234	C_7514111_10
<i>P18 - CDKN2C</i>	12885	C_1452499_10
<i>P16 - CDKN2A</i>	11515	C_12096259_10
<i>P15 - CDKN2B</i>	2069426	C_15858974_10
	3731239	C_27974751_10
	1063192	C_2618046_10

Quadro 1: Relação dos polimorfismos e registros de cada gene que foram analisados.

O volume final utilizado em cada solução foi de 25µl, contendo 20ng de DNA da amostra, 12,5µl de Taqman® GenotypingMaster Mix (concentração final 1X), 0,625µl da sonda (Quadro 1) com concentração de 40x (concentração final de 1x) e 8,875µl de água milli-Q®. Os seguintes ciclos foram utilizados na PCR: a fase inicial de desnaturação foi de 10 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos de 92°C por 15 segundos, 60°C por 90 segundos. O software utilizado para a análise foi “*Sequence Detection Software*”, versão 1.3 (Applied Biosystems, /ThermoFisher,

Foster City, USA). Nas figuras de 7 a 10, exemplificamos os resultados observados.

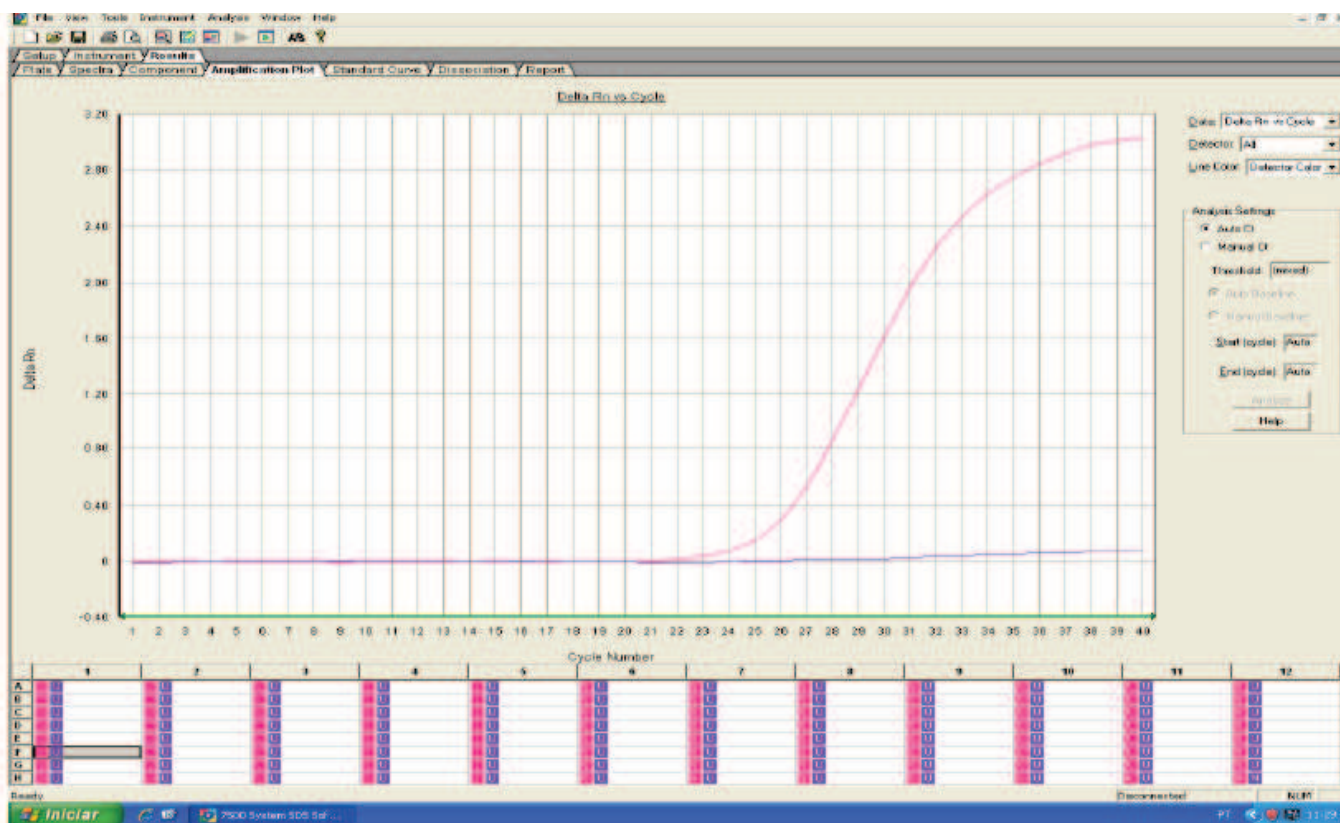


Figura 7: Representação gráfica para o resultado de um indivíduo que apresenta o genótipo homozigoto selvagem.

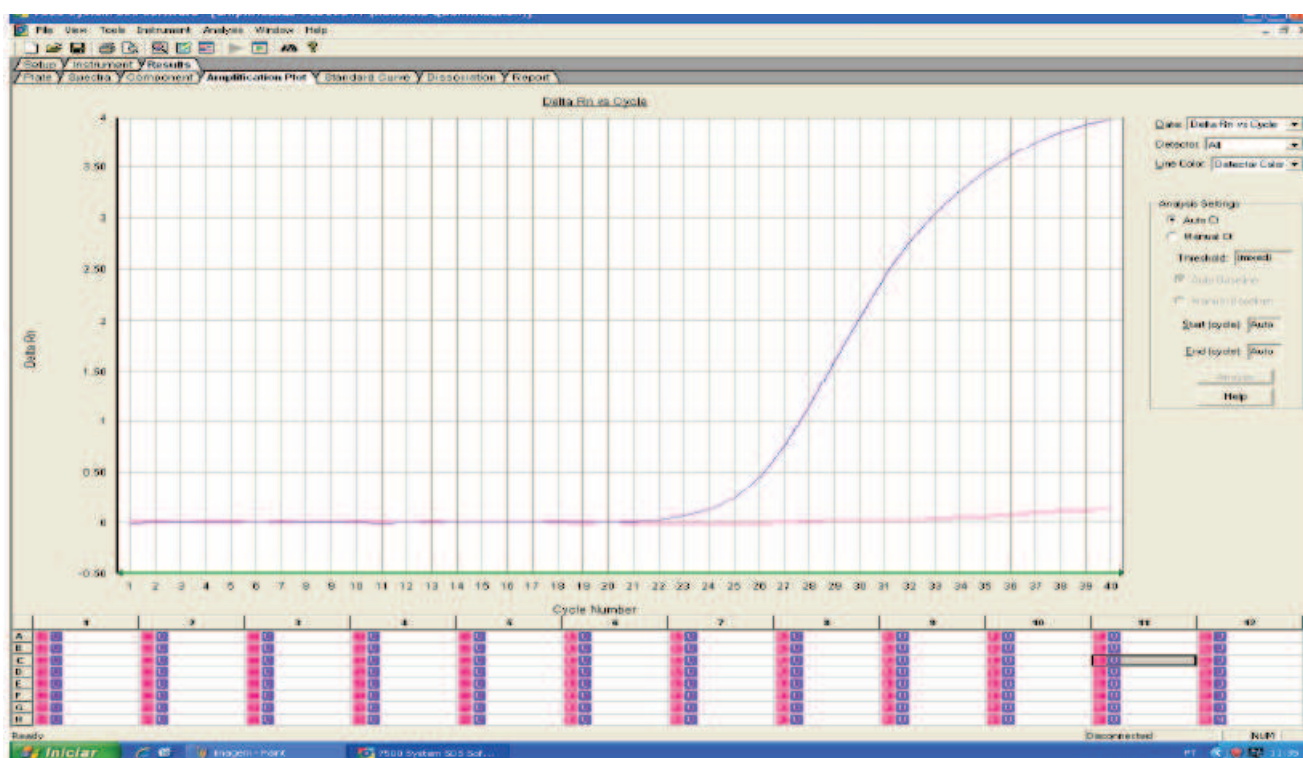


Figura 8: Representação gráfica para o resultado de um indivíduo que apresenta o genótipo homozigoto polimórfico.

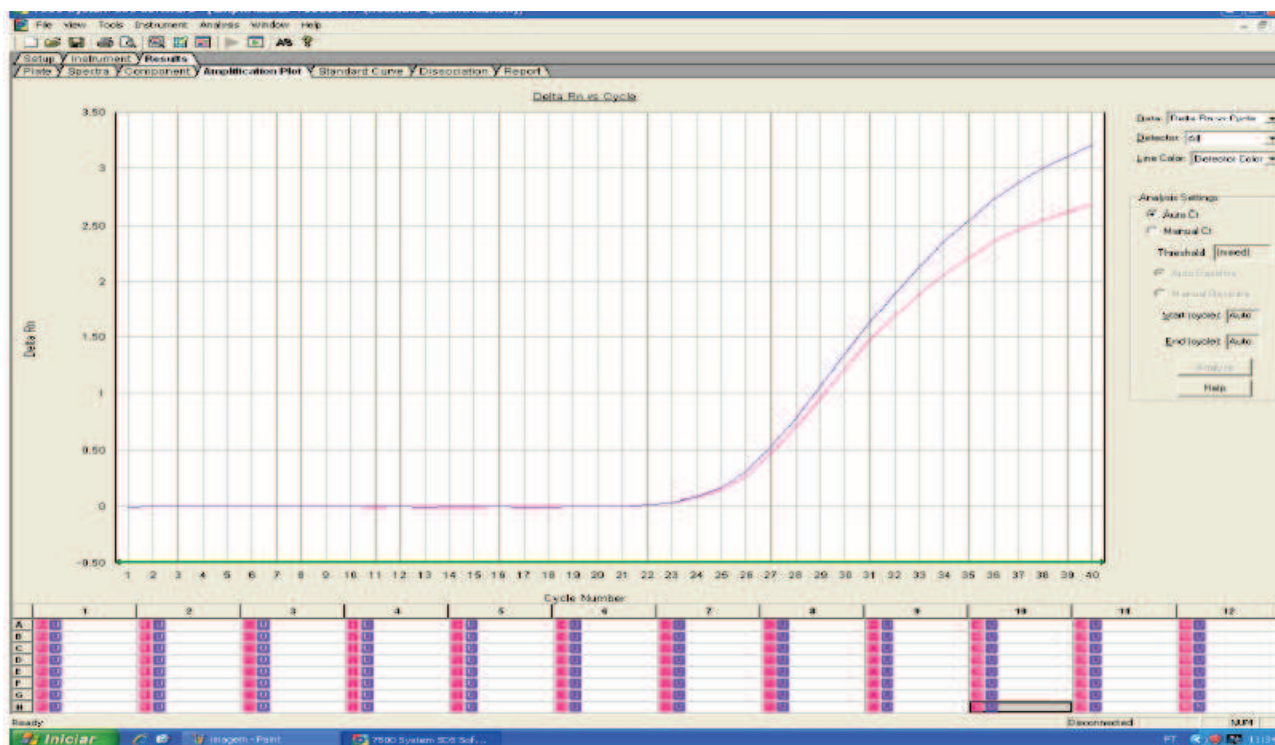


Figura 9: Representação gráfica para o resultado, onde as curvas indicam que o indivíduo apresenta o genótipo heterozigoto

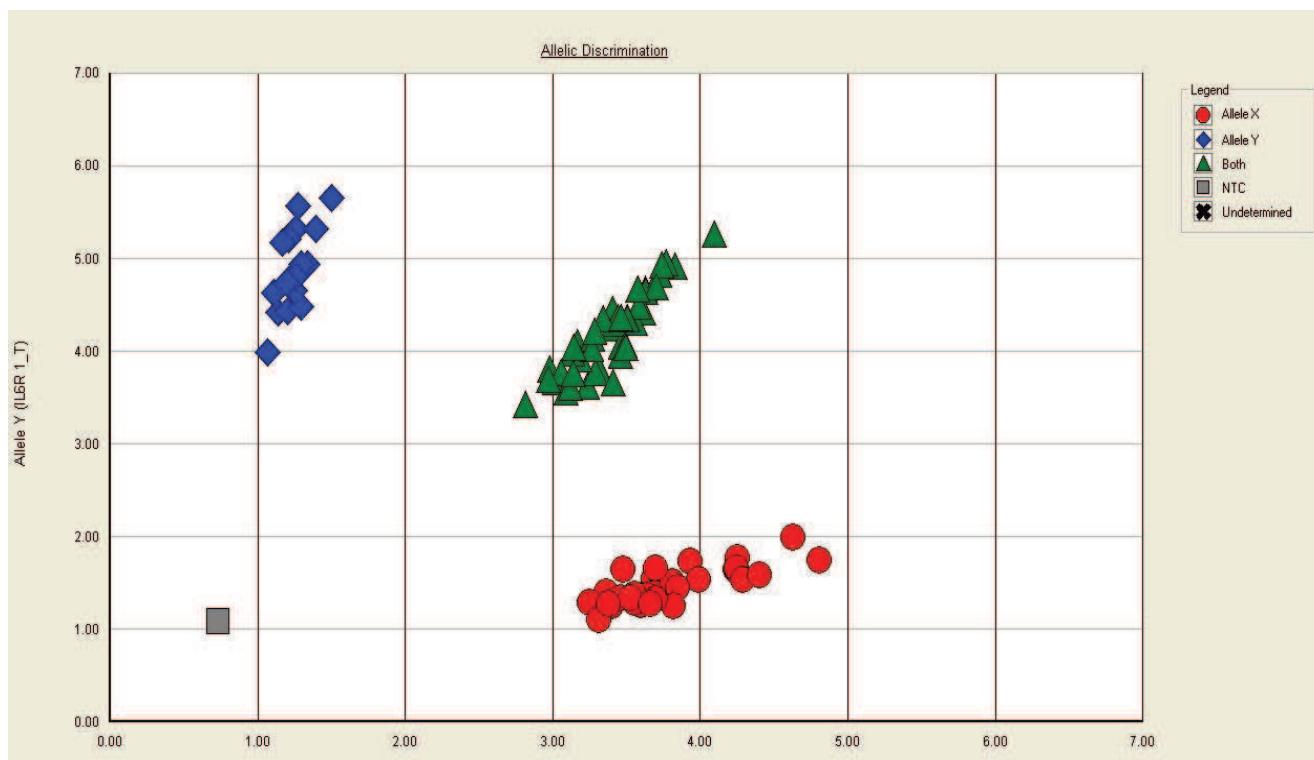


Figura 10: Em azul (losango), indica que as amostras são do alelo Y, ou seja, indica que são homozigotos selvagens; em verde (triângulo), as amostras são heterozigotas, em vermelho (círculo), as amostras são homozigotas e o quadrado indica o controle negativo.

3.2.4 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o teste χ^2 (Qui-Quadrado) ou o teste Exato de Fischer para verificar associação e/ou comparar proporções. Para se identificar possíveis fatores de risco para melhor ou pior evolução foi utilizado regressão logística múltipla. Os testes de Mann-Whitney, Wilcoxon ou Kruskal-Wallis foram usados para comparar variáveis aleatórias contínuas entre dois grupos. Para se verificar associações lineares entre variáveis, foi utilizado o

coeficiente de Spearman. A análise de regressão logística uni e/ou multivariada mostrou as variáveis de risco independentes. Foi utilizado também o Log-rank test e a curvas de Kaplan-Meier para análise de sobrevida livre de doença. Todos os testes foram conduzidos com um nível de significância de $p=0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico

O grupo de pacientes com CMT-s foi composto de 15 homens e 30 mulheres com idades entre $42,2 \pm 12,3$ anos. Enquanto o grupo controle foi composto por 32 homens e 68 mulheres com idade de $40,2 \pm 11,2$ anos, como descrito na Tabela 1, pacientes e controles foram similares em relação à idade ($p=0,745$) e gênero ($p=0,433$).

Fatores Clínicos		CMT-s	Controles	<i>p</i>
Idade (anos \pm DP)		42,2 \pm 12,3	40,2 \pm 11,20	0,745
Gênero	Masculino	30 (66,6%)	68 (68,0%)	0,433
	Feminino	15 (33,4%)	32 (32,0%)	

Tabela 1 – Características clínicas dos pacientes com Carcinoma Medular da Tireoide Esporádico (CMT-s) em comparação com o grupo controle.

O polimorfismo do gene *CDKN1A* (rs1059234) não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg e devido a isso foi excluído das análises estatísticas, os demais polimorfismos estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$).

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da análise de regressão logística comparando os casos de CMT-s com o grupo controle. Os polimorfismos *CDKN1B* (rs2066827) e *CDKN2A* (rs11515) demonstram uma associação com o CMT-s. Foi verificado que a presença do genótipo C/T ($p = 0,0014$; OR= 3,48; IC

95%= 1,67 - 7,29) e do genótipo T/T ($p= 0,0299$; OR= 0,41; IC 95%= 0,20 - 0,86) do gene *CDKN1B* (rs2066827) influenciaram no desenvolvimento do CMT-s. E da mesma forma, o genótipo C/C ($p= 0,0324$; OR= 2,51; IC 95%= 1,02 - 6,16) e C/G ($p= 0,0432$; OR= 0,42; IC 95%= 0,17 - 1,03) do gene *CDKN2A* (rs11515) também se relacionou com o desenvolvimento da doença.

Não houve diferença da presença ou ausência dos polimorfismos nos genes *CDKN1B* (rs34330), *CDKN1A* (rs1801270), *CDKN2C* (rs12885), *CDKN2A* (rs2069426) e *CDKN2B* (rs3731239 e rs1063192) entre casos de pacientes com CMT-s e o grupo controle.

Gene	SNP	Genotype	CMT (%)	Controle (%)	p-value*	OR	95% CI	
							High	Low
<i>CDKN1B</i>	rs2066827	G/G	37,78	59,79	0,3155	0,39	0,09	1,68
		G/T	57,78	27,84	0,0014	3,48	1,67	7,29
		T/T	4,44	12,37	0,0299	0,41	0,20	0,86
	rs34330	C/C	60,00	51,04	0,5940	1,46	0,71	2,98
		C/T	37,78	39,58	1,0000	0,95	0,46	1,96
		T/T	2,22	9,38	0,2070	0,28	0,05	1,74
<i>CDKN1A</i>	rs1801270	A/A	82,93	67,01	1,0000	1,17	0,28	4,84
		A/C	17,07	27,84	0,4381	0,59	0,25	1,41
		C/C	0,00	5,15	0,5577	1,53	0,69	3,39
<i>CDKN2C</i>	rs12885	G/G	70,73	77,32	0,3949	0,71	0,32	1,57
		G/T	26,83	22,68	0,5631	1,27	0,56	2,86
		T/T	4,44	0,00	0,2058	6,64	0,07	622,36
<i>CDKN2A</i>	rs11515	C/C	84,44	67,35	0,0324	2,51	1,02	6,16
		C/G	15,56	31,63	0,0432	0,42	0,17	1,03
		G/G	0,00	1,02	0,8335	0,71	0,01	66,93

CDKN2B	rs2069426	A/A	89,67	75,53	1,0000	0,75	0,23	2,42
		C/A	4,44	14,89	0,1915	0,31	0,07	1,28
		C/C	8,89	9,57	0,1858	2,34	0,90	6,05
	rs3731239	A/A	55,00	57,89	1,0000	0,72	0,36	1,46
		A/G	45,00	30,53	0,8044	1,51	0,73	3,15
		G/G	0,00	11,58	1,0000	0,94	0,31	2,82
	rs1063192	C/C	55,56	53,13	0,4257	2,14	0,77	5,96
		T/C	26,67	37,50	0,6055	0,61	0,28	1,33
		T/T	17,78	9,37	1,0000	1,10	0,54	2,24

Tabela 2: Comparação entre os perfis de genotipagem dos genes estudados de pacientes com carcinoma medular da tiróide esporádicos (CMT-s) e a população de controle, usando análise de regressão logística multivariada.

Em uma análise de regressão logística comparando os genótipos (homozigoto selvagem) com os genótipos polimórficos (heterozigoto + homozigoto polimórfico) pode-se verificar que a presença dos alelos polimórficos (GT+GG) do gene *CDKN1B* (rs2066827) foi mais frequente em pacientes com CMT-s (62,3%) do que no grupo controle (40,2%; $p = 0,038$), aumentando a suscetibilidade ao desenvolvimento de CMT em mais de 2 vezes (OR= 2,47; IC 95%= 1,048 - 5,833).

Ao contrário, a presença dos genótipos polimórficos (CG+GG) do gene *CDKN2A* (rs11515) foi menos frequente em pacientes com CMT-s (15,5%) do que no grupo controle (32,6%), diminuindo assim a suscetibilidade ao desenvolvimento da doença (OR= 0,174; IC 95= 0,048 - 0,627; $p = 0,0075$) (Tabela 3).

Gene	SNP	Genótipo	CMT-s (%)	Controles (%)	Valor p*	OR	IC 95%	
							Máximo	Mínimo
<i>CDKN1B</i>	rs2066827	GG	37,78	59,79	0,0388	2,472	1,048	5,833
		GT + TT	62,22	40,21				
<i>CDKN2A</i>	rs11515	CC	84,44	67,35	0,0075	0,174	0,048	0,627
		CG + GG	15,56	32,65				

Tabela 3: Comparação entre os perfis de genotipagem dos genes *CDKN1B* e *CDKN2A* de pacientes com carcinoma medular da tireóide esporádicos (CMT-s) e a população de controle, usando análise de regressão logística multivariada.

A presença do genótipo heterozigoto GT do gene *CDKN1B* (rs2066827) contribuiu com 8% para o desenvolvimento de CMT esporádico, enquanto que o genótipo CC do gene *CDKN2A* (rs11515) contribuiu com 3% do desenvolvimento da doença em nossa amostra, como demonstrado na Figura 11. Com esta análise, foi possível verificar a contribuição de cada polimorfismo para o desenvolvimento do CMT-s, levando em consideração a amostra utilizada neste estudo.

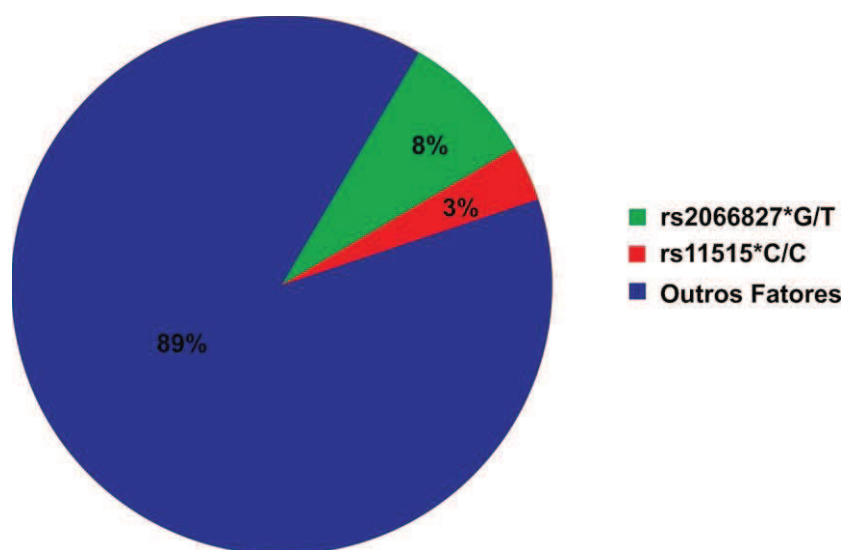


Figura 11: Representação gráfica da contribuição relativa dos genes *CDKN1B* e *CDKN2A* para o risco de carcinoma medular de tireoide esporádico de acordo com a análise de regressão *stepwise*.

Foi possível verificar associações entre pacientes com CMT-s e seus respectivos dados clínicos. Encontramos relação do polimorfismo rs1801270 do gene *CDKN1A* com a presença de extensão extra tireoidiana, do gene *CDKN2C* (rs12885) com o tamanho do tumor e também do gene *CDKN2B* (rs1063192) com a presença de metástase à distância. Não foi encontrada nenhuma associação com os demais polimorfismos: *CDKN1B* (rs2066827 e rs34330), *CDKN2A* (rs11515), *CDKN2B* (rs2069426 e rs3731239) conforme descrito na Tabela 4 e Tabela 5.

Dados Clínicos		CDKN1B (rs2066827)			CDKN1B (rs34330)			CDKN1A (rs1801270)		
		TT	TG + GG	Valor de p	CC	CT + TT	Valor de p	CC	CA + AA	Valor de p
%	Gênero (Masculino/Feminino)	80,0/20,0	26,6/73,4	0,053	60,0/40,0	80,0/20,0	1,000	85,71/14,29	81,49/18,51	1,000
	Recorrência local (Presença/Ausência)	2,43/97,56	7,31/92,68	1,000	8,0/9,2	12,5/87,5	0,636	5,88/94,11	2,94/97,06	0,085
	Metástase à distância (Presença/Ausência)	8,82/91,17	5,88/94,11	0,299	11,76/88,24	2,94/97,06	0,628	11,76/88,24	2,94/97,05	1,000
	Extensão extra tireoidiana (Presença/Ausência)	5,88/94,11	8,82/91,17	1,000	11,76/88,24	2,94/97,06	0,627	6,45/93,54	80,0/20,0	0,037
Mediana ± DP	Idade de Diagnóstico	37±12,76	42±12,27	0,840	35±13,16	47,5±9,94	0,063	39±12,62	55± 13,87	0,595
	Calcitonina pré-operatória	337,5± 3853,50	731± 801,62	0,959	222,0± 2856,06	759± 904,93	0,291	233± 2764,35	866,5± 730,24	0,327
	Calcitonina pós-operatória	2,02 ± 2,21	2,215± 383,11	0,345	8,1± 2589,66	2,4± 477,56	0,681	22,0± 2500,58	1,5± 3,236	0,054
	Tempo livre de Doença	6±12,67	26± 38,75	0,262	75± 56,57	7±12,60	0,296	11,0± 33,748	-	-
	Tamanho do tumor	1,9±0,69	2 ± 1,83	0,567	2,1± 1,42	1,7±1,74	0,143	2,0 ± 1,56	1,5 ± 1,83	0,165

Tabela 4: Resultados de todos os polimorfismos estudados, em comparação com os dados clínicos analisados. Apresentação de valores em porcentagem e mediana em relação ao genótipo de cada polimorfismo.

CDKN2C (rs12885)			CDKN2A (rs11515)			CDKN2B (rs2069426)			CDKN2B (rs3731239)			CDKN2B (rs1063192)		
GG	GT + TT	Valor de p	CC	CG + GG	Valor de p	CC	CA + AA	Valor de p	AA	AG + GG	Valor de p	TT	TC + CC	Valor de p
36,7/63,3	16,7/83,3	0,451	25,0/75,0	8,33/91,67	0,670	12,5/87,5	25,0/75	0,384	21,42/78,57	0,0/100,0	0,209	12,5/87,5	16,6/83,4	0,832
5,4/94,59	8,1/91,89	0,567	13,04/86,96	0,0/100,0	1,000	7,4/92,6	0,0/100,0	0,483	7,40/92,60	3,70/96,29	0,622	6,25/93,75	9,09/90,91	1,000
14,70/85,29	0,0/100,0	0,269	4,34/95,64	25,0/75,0	1,000	50,0/50,0	9,52/90,47	0,487	8,33/91,67	12,5/87,5	1,000	0,0/100,0	36,6/63,4	0,026
8,82/91,17	5,88/94,11	1,000	15,78/84,22	0,0/100,0	1,000	100,0/0,0	0,0/15,0	1,000	8,33/91,67	12,5/87,5	0,611	7,14/92,85	22,22/77,78	0,148
40,5±12,94	39± 9,94	0,742	39±12,25	44±13,77	0,410	44±11,34	27±11,06	0,122	43,5±14,22	40,5±9,21	0,776	40,5±12,78	47±11,94	0,787
348,5± 749,14	932,0± 888,18	0,427	759,5± 860,25	-	-	759,5± 896,83	244± 830,31	0,370	244± 1025,06	788± 103,59	0,734	731± 419,59	957± 1047,90	0,360
8,1± 402,2	2,2± 2500,58	0,341	2± 433,33	26±18,44	0,272	2,43± 415,19	1,0±20,78	0,793	2,43± 541,47	6± 10,18	0,969	4,75± 425,56	1,85± 0,38	0,538
26± 46,51	75± 37,89	0,099	26±38,03	-	-	75± 38,08	-	-	26± 37,20	80±1,45	0,511	75± 1,25	26± 39,94	0,208
2,9± 1,8	1,5± 0,7	0,032	1,9±2,05	1,8±0,52	0,915	1,8±1,92	2,6±1,43	0,125	2,3±2,10	1,9±1,44	1,000	2,4± 1,99	1,7± 1,56	0,897

Polimorfismos x Dados clínicos	Gênero	Idade de diagnóstico	Calcitonina pré-operatória	Calcitonina pós-operatória	Recorrência local	Tempo livre de doença	Metástase à distância	Tamanho do tumor	Extensão extra tireoidiana
<i>CDKN1B</i> (rs2066827)	0,053	0,840	0,959	0,345	1,000	0,262	0,299	0,567	1,000
<i>CDKN1B</i> (rs34330)	1,000	0,063	0,291	0,681	0,636	0,296	0,628	0,143	0,627
<i>CDKN1A</i> (rs1801270)	1,000	0,595	0,327	0,054	0,085	-	1,000	0,165	0,037
<i>CDKN2C</i> (rs12885)	0,452	0,742	0,427	0,341	0,567	0,099	0,269	0,032	1,000
<i>CDKN2A</i> (rs11515)	0,670	0,410	-	0,272	1,000	-	1,000	0,915	1,000
<i>CDKN2B</i> (rs2069426)	0,384	0,122	0,370	0,793	0,483	-	0,487	0,125	1,000
<i>CDKN2B</i> (rs3731239)	0,209	0,776	0,734	0,969	0,622	0,511	1,000	1,000	0,611
<i>CDKN2B</i> (rs1063192)	0,832	0,787	0,360	0,538	1,000	0,208	0,026	0,8978	0,148

Tabela 5: Resultados de todos os polimorfismos estudados, em comparação com os dados clínicos analisados apenas com os valores de p. Os números em cada célula representam o valor de p de coluna respectiva associado com a linha.

A presença dos genótipos polimórficos CA+AA do gene *CDKN1A* (rs1801270) foi mais frequente em pacientes com extensão extra tireoidiana (60% - p= 0,037) do que o genótipo selvagem (AA = 8%) (Figura 14).

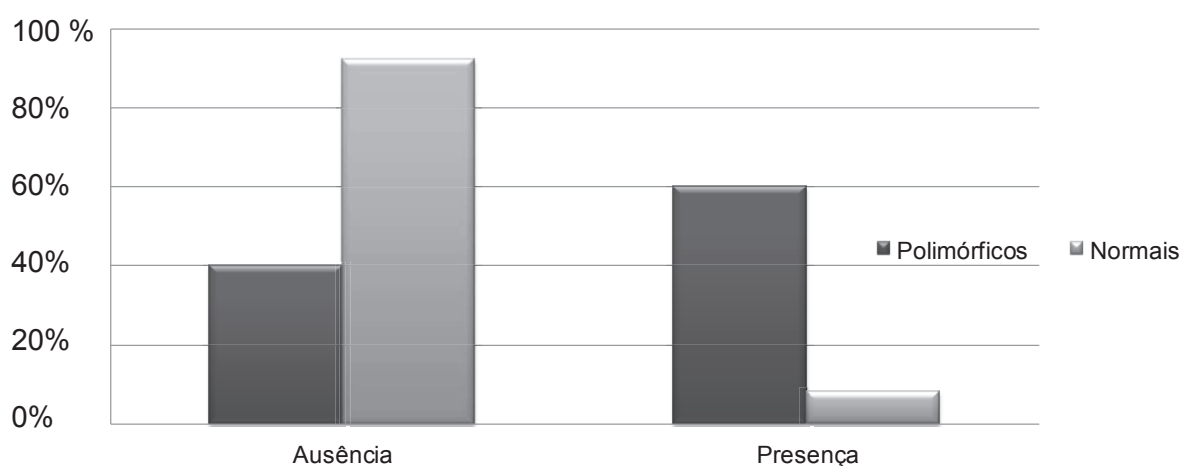


Figura 14: Representação da ausência e presença da extensão extratireoidiana em pacientes com genótipo polimórfico e normal para o CMT-s.

Além disso, somente os pacientes com a presença do alelo polimórfico do gene *CDKN2B* (rs1063192) apresentaram metástase à distância no diagnóstico (TC+CC= 36,6%, $p= 0,0261$) (Figura 15).

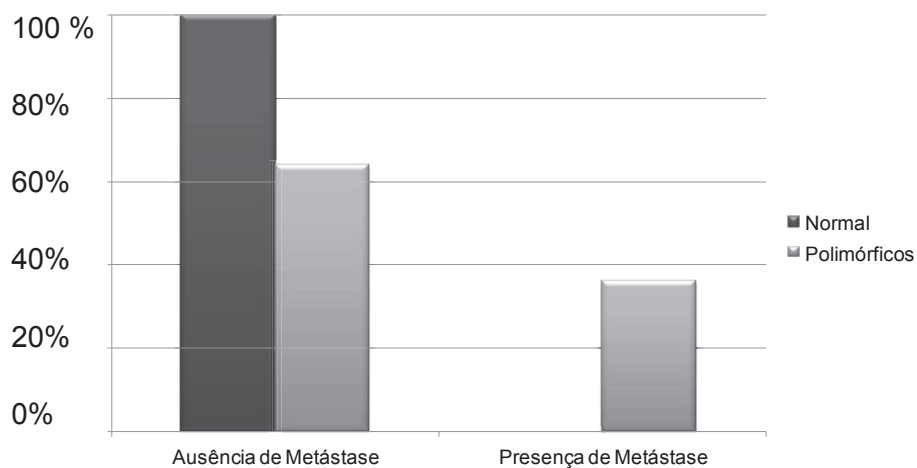


Figura 15: Representação da ausência e presença de metástase em pacientes com genótipo polimórfico e normal para o CMT-s.

A presença do genótipo polimórfico (GT+TT) do gene *CDKN2C* (rs12885) se associou com a menor média de tamanho dos tumores ($1,5 \pm 0,7$ cm de diâmetro; $p=0,032$) quando comparados com o genótipo selvagem (GG = $2,9 \pm 1,8$ cm de diâmetro) (Figura 16).

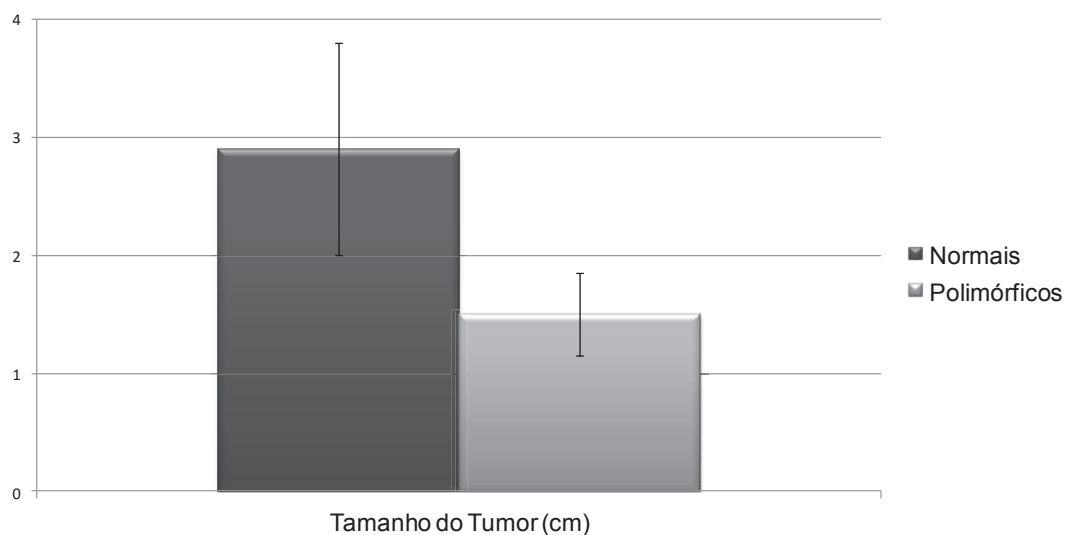


Figura 16: Representação do tamanho do tumor (cm) em pacientes com genótipo polimórfico e normal para o CMT-s.

Estes resultados foram publicados em Setembro/2014 na revista Eur. J. Endocrinol (Impacto 4.069) conforme artigo abaixo (autorização da editora para publicação do artigo na dissertação – ANEXO 6).

Clinical Study

R B Barbieri and others

Cell cycle control genes and sporadic MTC

171:6

761–767

Polymorphisms of cell cycle control genes influence the development of sporadic medullary thyroid carcinoma

R B Barbieri, N E Bufalo, R Secolin, L V M Assumpção, R M B Maciel¹, J M Cerutti¹ and L S Ward

University of Campinas (FCM - Unicamp), 126, Tessalia Vieira de Camargo, Street. Cidade Universitaria Zeferino Vaz, Campinas – São Paulo, 13083-887 Brazil and ¹Federal University of Sao Paulo (Unifesp), 669, Pedro Toledo Street, São Paulo-SP 04039-032, Brazil

Correspondence should be addressed to L S Ward
Email
ward@fcm.unicamp.br

Abstract

Background: The role of key cell cycle regulation genes such as, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, and *CDKN2C* in sporadic medullary thyroid carcinoma (s-MTC) is still largely unknown.

Methods: In order to evaluate the influence of inherited polymorphisms of these genes on the pathogenesis of s-MTC, we used TaqMan SNP genotyping to examine 45 s-MTC patients carefully matched with 98 controls.

Results: A multivariate logistic regression analysis demonstrated that *CDKN1B* and *CDKN2A* genes were related to s-MTC susceptibility. The rs2066827*GT + GG *CDKN1B* genotype was more frequent in s-MTC patients (62.22%) than in controls (40.21%), increasing the susceptibility to s-MTC (OR = 2.47; 95% CI = 1.048–5.833; *P* = 0.038). By contrast, the rs11515*CG + GG of *CDKN2A* gene was more frequent in the controls (32.65%) than in patients (15.56%), reducing the risk for s-MTC (OR = 0.174; 95% CI = 0.048–0.627; *P* = 0.0075). A stepwise regression analysis indicated that two genotypes together could explain 11% of the total s-MTC risk. In addition, a relationship was found between disease progression and the presence of alterations in the *CDKN1A* (rs1801270), *CDKN2C* (rs12885), and *CDKN2B* (rs1063192) genes. WT rs1801270 *CDKN1A* patients presented extrathyroidal tumor extension more frequently (92%) than polymorphic *CDKN1A* rs1801270 patients (50%; *P* = 0.0376). Patients with the WT *CDKN2C* gene (rs12885) presented larger tumors (2.9 ± 1.8 cm) than polymorphic patients (1.5 ± 0.7 cm; *P* = 0.0324). On the other hand, patients with the polymorphic *CDKN2B* gene (rs1063192) presented distant metastases (36.3%; *P* = 0.0261).

Conclusion: In summary, we demonstrated that *CDKN1B* and *CDKN2A* genes are associated with susceptibility, whereas the inherited genetic profile of *CDKN1A*, *CDKN2B*, and *CDKN2C* is associated with aggressive features of tumors. This study suggests that profiling cell cycle genes may help define the risk and characterize s-MTC aggressiveness.

European Journal of
Endocrinology
(2014) 171, 761–767

Introduction

Although responsible for no more than 3–5% of all thyroid cancers, medullary thyroid carcinoma (MTC) is responsible for more than 14% of thyroid cancer-related deaths (1, 2). The majority of MTC cases (>75%) are sporadic MTC (s-MTC), even though up to 40% of these so-called sporadic cases may be caused by somatic RET mutations (3). Despite the importance of the RET receptor, it is clear that other signal transduction pathways, tyrosine kinase receptors, and tumor suppressor genes are involved in MTC tumorigenesis

and progression (4). In fact, the molecular basis of s-MTC is still poorly understood (5). It is plausible that, similar to other malignancies, s-MTC is caused by multiple common genetic variants in different susceptibility genes commonly called 'low-penetrance genes' (6).

Dysregulation of the cell cycle is a hallmark of many cancers (7, 8, 9). Control and timing of the cell cycle involve checkpoints and regulatory pathways that ensure the fidelity of DNA replication and chromosome

Clinical Study	R B Barbieri and others	Cell cycle control genes and sporadic MTC	171:6	762
----------------	-------------------------	---	-------	-----

segregation (10). Alterations of genes involved in the G1 phase of the cell cycle, including the cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), and CDK inhibitors (CDKIs), are common events in neoplastic development of a series of different types of tumors (11). Their role in s-MTC is still largely unknown.

Thyroid tumors show low expression of the CDKI P27 (Kip1), and recent evidence has demonstrated that P27 is downregulated by the active *RET* mutant (12). These data suggest that a decreased P27 (CDKN1B) activity is an important event during thyroid tumorigenesis. However, *p27*^{-/-} mice develop MEN-like tumors only in combination with the loss of another CDKI, *p18* (Ink4c). Hence, it is possible that *p18* (*Cdkn2c*) and *p27* are functional collaborators in the suppression of tumorigenesis, and that the loss of both may also be important to MTC development (12).

There have been some reports associating polymorphisms of cell cycle genes with s-MTC (13, 14, 15, 16). The *CDKN1B* V109G polymorphism was reported to influence the clinical course of patients presenting sporadic MTC (15). In addition, cell cycle and apoptosis regulators have long been recognized as critical in the initiation of malignant cell proliferation and this study has recently demonstrated the influence of the presence of a C homozygous allele for the *TP53* gene on the susceptibility to s-MTC (17).

This study aimed to evaluate the role of genetic variations in key cell cycle regulation genes *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, and *CDKN2C* in sporadic medullary thyroid cancer pathogenesis.

Patients and methods

This study was approved by the Ethics and Research Committees of the Federal University of São Paulo (Unifesp) and the State University of Campinas (Unicamp).

Patients

A total of 45 patients diagnosed with s-MTC based on cytology and elevated serum calcitonin levels, and who have signed an informed consent form, were enrolled in this study. As described previously, none of the s-MTC patients had any other types of malignant tumor or any history of thyroid tumor in first-degree relatives (14). All patients were sequenced for the complete *RET* gene and no mutation was identified. Ninety-eight healthy individuals from the same region and matched for sex and age with the enrolled patients served as controls. Individuals with a history of past thyroid disease and antecedents of

malignancy were excluded. An in-person questionnaire, described previously, was used to collect demographic and health condition information (17). All data, including nodule size, tumor histological features, and laboratory test results, were confirmed using the hospital records of the patient. All patients were managed using the same standard protocol according to the recommendations of current guidelines (18, 19).

Genotyping

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes obtained from both patients and controls using a standard phenol-chloroform protocol. Nine polymorphisms were genotyped: *CDKN1A* (rs1801270 and rs1059234), *CDKN1B* (rs2066827 and rs34330), *CDKN2A* (rs11515), *CDKN2B* (rs2069426, rs3731239, and rs1063192), and *CDKN2C* (rs12885) using the TaqMan system (Applied Biosystems), as described previously (17). These SNPs were chosen because they have previously been associated with thyroid carcinoma or other tumor risks as described in Table 1 (13, 15, 16, 20, 21, 22).

Statistical analysis

The *t*-test and the Fisher exact test were employed in order to evaluate differences in age and sex using the SAS statistical software (Statistical Analysis System, version 9.1.3, 2002–2003). For comparison of continuous or orderable variables between two groups, we applied the Mann–Whitney *U* test. The Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium between SNPs were performed using the HAPLOVIEW software (23). Logistic and stepwise regressions were used to analyze the association between polymorphisms and genes using the

Table 1 Sequence-specific primers used for genotyping *CDKN1B*, *CDKN1A*, *CDKN2C*, *CDKN2A*, and *CDKN2B* genes and the corresponding reference of their description in the risk of other tumors.

Genes	SNP	Registration applied
<i>p27</i> – <i>CDKN1B</i>	rs2066827	C_11916245_10
	rs34330	C_2402292_10
<i>p21</i> – <i>CDKN1A</i>	rs1801270	C_14977_20
<i>p18</i> – <i>CDKN2C</i>	rs12885	C_1452499_10
<i>p16</i> – <i>CDKN2A</i>	rs11515	C_12096259_10
	rs3088440	C_16008027_10
<i>p15</i> – <i>CDKN2B</i>	rs2069426	C_15858974_10
	rs3731239	C_27974751_10
	rs1063192	C_2618046_10

Clinical Study	R B Barbieri and others	Cell cycle control genes and sporadic MTC	171:6	763
----------------	-------------------------	---	-------	-----

R software (24). All *P* values were adjusted for multiple comparisons by the Bonferroni correction. *Post-hoc* statistical power of the sample was evaluated using the GPower software (25), with a statistically significant level of ≤ 0.05 for all tests.

Results

Sporadic MTC patients (15 males and 30 females; 42.20 ± 12.30 years old) and controls (30 males and 68 females; 40.30 ± 11.20 years old) were similar concerning age ($P=0.356$) and sex ($P=0.745$). The rs1059234 polymorphism of *CDKN1A* was not in the HWE, possibly because of the relatively small size of the studied groups and the high genetic heterogeneity of the Brazilian population. Thereby, this polymorphism was excluded from further statistical analyses.

Influence of cell cycle control gene polymorphisms on the susceptibility to s-MTC

A univariate logistic regression, given in Table 2, showed associations between s-MTC and the following genotypes:

rs2066827*GT ($P=0.0014$; OR=3.48; 95% CI=1.67–7.29) and rs2066827*TT ($P=0.0299$; OR=0.41; 95% CI=0.20–0.86), in the *CDKN1B* gene; and rs11515*C/C ($P=0.0324$; OR=2.51; 95% CI=1.02–6.16) and rs11515*CG ($P=0.0432$; OR=0.42; 95% CI=0.17–1.03), in the *CDKN2A* gene.

A multivariate logistic regression analysis confirmed the importance of the inheritance of *CDKN1B* and *CDKN2A* gene variants (OR=2.472 and OR=0.174 respectively), as detailed in Table 3.

The rs2066827*GT+GG *CDKN1B* genotype was over-represented in s-MTC patients (62.22%) when compared with controls (40.21%; $P=0.038$), increasing substantially the susceptibility to s-MTC (OR=2.47; 95% CI=1.048–5.833; $P=0.038$). By contrast, the polymorphic rs11515*CG+GG of the *CDKN2A* gene was more expressed in the control population (32.65%) than in s-MTC patients (15.56%; $P=0.0075$), reducing the risk of developing s-MTC (OR=0.174; 95% CI=0.048–0.627; $P=0.0075$).

A stepwise regression analysis indicated that, in our sample, *CDKN1B* rs2066827*GT genotype contributed to 8% for the total risk of developing an s-MTC, whereas *CDKN2A* rs11515*CC contributed to 3%. These two

Table 2 Genotyping characteristics of patients with sporadic medullary thyroid cancer (s-MTC) compared with the group of controls.

Genes	SNP	Genotype	s-MTC (%)	Controls (%)	<i>P</i> value ^a	OR	95% CI	
							High	Low
<i>CDKN1B</i>	rs2066827	GG	37.78	59.79	0.3155	0.39	0.09	1.68
		GT	57.78	27.84	0.0014	3.48	1.67	7.29
		TT	4.44	12.37	0.0299	0.41	0.20	0.86
	rs34330	CC	60.00	51.04	0.5940	1.46	0.71	2.98
		CT	37.78	39.58	1.0000	0.95	0.46	1.96
<i>CDKN1A</i>	rs1801270	TT	2.22	9.38	0.2070	0.28	0.05	1.74
		AA	82.93	67.01	1.0000	1.17	0.28	4.84
		AC	17.07	27.84	0.4381	0.59	0.25	1.41
		CC	0.00	5.15	0.5577	1.53	0.69	3.39
<i>CDKN2C</i>	rs12885	GG	70.73	77.32	0.3949	0.71	0.32	1.57
		GT	26.83	22.68	0.5631	1.27	0.56	2.86
		TT	2.44	0.00	0.2058	6.64	0.07	622.36
<i>CDKN2A</i>	rs11515	CC	84.44	67.35	0.0324	2.51	1.02	6.16
		CG	15.56	31.63	0.0432	0.42	0.17	1.03
		GG	0.00	1.02	0.8335	0.71	0.01	66.93
<i>CDKN2B</i>	rs2069426	AA	86.67	75.53	1.0000	0.75	0.23	2.42
		CA	4.44	14.89	0.1915	0.31	0.07	1.28
		CC	8.89	9.57	0.1858	2.34	0.90	6.05
	rs3731239	AA	55.00	57.89	1.0000	0.72	0.36	1.46
		AG	45.00	30.53	0.8044	1.51	0.73	3.15
		GG	0.00	11.58	1.0000	0.94	0.31	2.82
	rs1063192	CC	55.56	53.13	0.4257	2.14	0.77	5.96
		TC	26.67	37.50	0.6055	0.61	0.28	1.33
		TT	17.78	9.38	1.0000	1.10	0.54	2.24

^aCorrected by the Bonferroni adjustment.

Clinical Study	R B Barbieri and others	Cell cycle control genes and sporadic MTC	171:6	764
----------------	-------------------------	---	-------	-----

Table 3 Comparison between genotyping profiles *CDKN1B* and *CDKN2A* of patients with sporadic medullary thyroid carcinoma (s-MTC) and control population, using multivariate logistic regression analysis.

Genes	SNP	Genotype	s-MTC (%)	Controls (%)	P value ^a	OR	95% CI	
							High	Low
<i>CDKN1B</i>	rs2066827	GG	37.78	59.79	0.0388	2.472	1.048	5.833
		GT+TT	62.22	40.21				
<i>CDKN2A</i>	rs11515	CC	84.44	67.35	0.0075	0.174	0.048	0.627
		CG+GG	15.56	32.65				

^acorrected by Bonferroni adjustment.

genotypes together could explain 11% of the total s-MTC risk (Fig. 1).

Genotype relationship with features of aggressiveness in patients with s-MTC

For these analyses, patients were divided into two groups: WT (homozygous normal alleles) and polymorphic (a combination of homozygous polymorphic + heterozygous alleles), for each gene. Clinical and pathological characteristics, including age, sex, tumor stage (T, N, and M), and size, extra thyroidal extension, serum calcitonin levels, and recurrence in patients were analyzed and compared with their genetic profile.

The Mann–Whitney *U* test demonstrated that patients with WT gene presented extrathyroidal tumor extension more frequently (92%) than patients with polymorphic gene in rs1801270 *CDKN1A* gene (50%; $P=0.0376$).

Patients with WT *CDKN2C* gene (rs12885) presented larger tumors (2.9 ± 1.8 cm) than patients with polymorphic gene (1.5 ± 0.7 cm; $P=0.0324$). By contrast, only patients with polymorphic *CDKN2B* gene (rs1063192) presented distant metastases (36.3%; $P=0.0261$).

We were unable to find any other associations between the profile of the studied genes and the clinical or pathological characteristics of patients.

Discussion

This case–control study is, to the best of our knowledge, the first to investigate the association of *CDKN1B*, *CDKN1A*, *CDKN2C*, *CDKN2A*, and *CDKN2B* polymorphisms and the susceptibility to s-MTC. Besides the demonstration that *CDKN1B* and *CDKN2A* genes were related to s-MTC susceptibility, this study also found evidences that *CDKN1A*, *CDKN2B*, and *CDKN2C* gene variants are associated with tumor features of aggressiveness.

Recent studies have indicated that SNPs of genes in cell cycle control play an important role in carcinogenesis and may lead to altered susceptibility to different cancers (26, 27, 28). An association of *CDKN1B* (rs2066827) and *CDKN2A* (rs11515) gene variants was found with the presence of s-MTC. It was demonstrated that the rs2066827*GT+GG *CDKN1B* genotype was over-represented in s-MTC patients when compared with controls, increasing the susceptibility to this tumor.

The codon 109 in the *CDKN1B* gene SNP results in a valine to glycine (T>G) substitution (V109G – rs2066827) (29). The G allele of the *CDKN1B* gene (rs2066827) has been associated with an increased risk for thyroid (13), squamous cell (28), prostate, and breast cancers (27, 30). However, whether this polymorphism is associated with a better or worse prognosis remains uncertain (13, 21, 28, 31). Pasqualini *et al.* also found differences in the frequency of the WT (TT – 53.6%) and polymorphic alleles

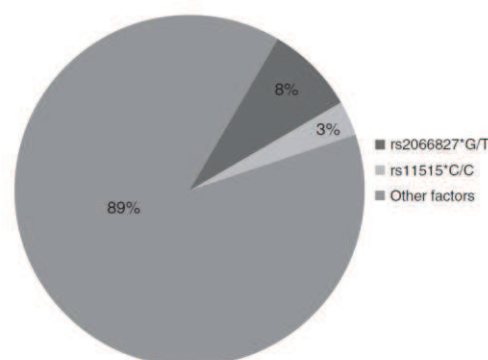


Figure 1 Graphical representation of the relative contribution of the *CDKN1B* and *CDKN2A* genes to sporadic medullary thyroid carcinoma risk according to a stepwise regression analysis.

Clinical Study	R B Barbieri and others	Cell cycle control genes and sporadic MTC	171:6	765
----------------	-------------------------	---	-------	-----

(TG+GG – 46.4%) between patients and controls ($P=0.048$), suggesting a risk of the disease in individuals bearing the *CDKN1B* rs2066827 polymorphic allele (13). The V109G polymorphism falls within a region (amino acids 97–151) that physically interacts with the activation of the domain-binding protein, which triggers the proteolytic degradation of P27 (32). In fact, a reduced P27 expression has been associated with a poor clinical prognosis in head and neck tumors (33). In addition, it has been demonstrated that amino acid changes around position 108, such as the ones induced by V109G polymorphism, can reduce P27kip1 cytosolic translocation, increasing its nuclear stability (31, 34). However, no evidence has been provided to support the association of *CDKN1B* polymorphisms with tumor progression or outcome in MTC (15).

In the study population, polymorphic rs11515*CG+GG of *CDKN2A* gene was expressed more in the control population than in s-MTC patients, hence presenting a protective effect to s-MTC development. *CDKN2A* gene polymorphisms have largely been investigated in different types of cancers (20, 22, 35). The SNP (rs11515 – C98A) *CDKN2A* gene determines a non-synonymous serine-to-arginine substitution located in the 3'-UTR of exon 3 (36). In fact, similarly, we observed for s-MTC, *CDKN2A* gene rs11515 polymorphism was also considered a protective factor against cervical cancer (35). *CDKN2A* gene (rs11515) polymorphism may affect the DNA-binding zinc finger motif, thus modifying p21 expression and function (37). Additionally, the overexpression of p21 has been demonstrated to prevent mammalian cell proliferation and inhibit all cyclin-CDK complexes, suggesting that p21 is a universal inhibitor of cyclin-CDK complexes (38).

We also found a relationship between tumor aggressiveness and the presence of variants of the *CDKN1A* (rs1801270), *CDKN2C* (rs12885), and *CDKN2B* (rs1063192) genes.

Patients presenting polymorphic *CDKN1A* (rs1801270) less frequently have extrathyroidal tumor extension, suggesting that the inheritance of this *CDKN1A* polymorphism may be associated with a better outcome. A study of cervical cancer in a Chinese population also showed a significant association between the polymorphic allele of the *CDKN1A* (rs1801270) gene and a decreased risk of disease (39). *CDKN1A* (rs1801270) polymorphisms were demonstrated to increase the risk of second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of head and neck (31). The SNP (rs1801270) within the *CDKN1A* codon 31 results in a substitution of

arginine for serine in a conserved region of the protein and may affect the DNA-binding affinity and thus the physiological function of p21 (40). The p21 protein plays a role in cell cycle regulation. It binds to cyclin-CDK complexes to arrest cell cycle progression at the G1 phase. The transcription of p21 is partially regulated by p53, which binds to the p21 promoter and induces expression of p21. Therefore, alterations in the functional domains as well as in the promoter region of p21 could be affected by SNPs and affect p21 functionality (41). *CDKN1A* is often misregulated in human cancers, but depending on the cellular context and other circumstances, it can act both as a tumor suppressor and as an oncogene (42).

The molecular mechanism underlying a possible protective effect of the *CDKN1A* (rs1801270) and *CDKN2C* (rs12885) polymorphic alleles in cancer is unclear. The *CDKN2C* gene, involved in cell cycle regulation, is located at 1p32. A frequent finding in MTC tumors is the loss of heterozygosity at chromosome 1p, indicating a potential tumor suppressor gene in this locus (4). Homozygous deletion of the *CDKN2C* gene was also observed in the human MTC cell line (TT) bearing a RET mutation (16). These data indicate that the *CDKN2C* gene may act as a tumor suppressor and may facilitate MTC development (4).

Regarding *CDKN2B* gene polymorphism (rs1063192), we found distant metastases only in polymorphic patients, suggesting an association of this polymorphism with tumor aggressiveness. The polymorphism rs1063192 is located within a gene encoding *CDKN2B*, which is also known as *p15* (*CDKN2B*), a well-known tumor suppressor gene involved in the retinoblastoma (Rb) pathway (43). This region on chromosome 9p21 was implicated as a hotspot locus showing the association with various diseases, including myocardial infarction (44, 45), coronary artery disease (46, 47), type 2 diabetes (48, 49), glioma (50), and endometriosis (51); however, there is no report of a possible effect in thyroid cancer.

In conclusion, we found evidence that variations in some cell cycle genes are associated with both susceptibility and progression of s-MTC. As usually observed in studies concerning the effects of polymorphisms, no one demonstrated a highly significant association (52). Although functional evaluation and larger studies are needed to confirm the observed associations, our findings contribute to the identification of the various factors involved in the pathogenesis of s-MTC. It is suggested that profiling cell cycle genes may help define the risk for s-MTC and characterize tumor aggressiveness.

Clinical Study	R B Barbieri and others	Cell cycle control genes and sporadic MTC	171:6	766
----------------	-------------------------	---	-------	-----

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This study was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) under the grant number 07067-5. L S Ward, R M B Maciel, and J M Cerutti are researchers of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Acknowledgements

The authors thank the team of statisticians of the Faculty of Medical Sciences and Espaço da Escrita – Coordenadoria Geral da Universidade – UNICAMP – for the language services provided and for all their valuable suggestions and insights.

References

- Massoli N & Mazzaferri EL. Diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. *Clinics in Laboratory Medicine* 2004 **24** 49–83. (doi:10.1016/j.cll.2004.01.006)
- Sippel RS, Kunnimalaiyaan M & Chen H. Current management of medullary thyroid cancer. *Oncologist* 2008 **13** 539–547. (doi:10.1634/theoncologist.2007-0239)
- Asai N, Jijiwa M, Enomoto A, Kawai K, Maeda K, Ichihara M, Murakumo Y & Takahashi M. RET receptor signaling: dysfunction in thyroid cancer and Hirschsprung's disease. *Pathology International* 2006 **56** 164–172. (doi:10.1111/j.1440-1827.2006.01942.x)
- Santarpia L, Ye L & Gagel RF. Beyond RET: potential therapeutic approaches for advanced and metastatic medullary thyroid carcinoma. *Journal of Internal Medicine* 2009 **266** 99–113. (doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02112.x)
- Hu M & Cote GJ. Medullary thyroid carcinoma: who's on first? *Thyroid* 2012 **22** 451–453. (doi:10.1089/thy.2012.2205.ed)
- Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000 **405** 847–856. (doi:10.1038/35015718)
- Butt AJ, Caldon CE, McNeil CM, Swarbrick A, Musgrove EA & Sutherland RL. Cell cycle machinery: links with genesis and treatment of breast cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2008 **630** 189–205. (doi:10.1007/978-0-387-78818-0_12)
- Nam EJ & Kim YT. Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* 2008 **18** 1169–1182. (doi:10.1111/j.1525-1438.2008.01191.x)
- Pharoah PD, Tyrer J, Dunning AM, Easton DF & Ponder BA. Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk. *PLoS Genetics* 2007 **3** e42. (doi:10.1371/journal.pgen.0030042)
- Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996 **274** 1664–1672. (doi:10.1126/science.274.5293.1664)
- Barbieri F, Cagnoli M, Ragni N, Foglia G, Bruzzo C, Pedulla F & Alama A. Increased cyclin D1 expression is associated with features of malignancy and disease recurrence in ovarian tumors. *Clinical Cancer Research* 1999 **5** 1837–1842.
- Joshi PP, Kulkarni MV, Yu BK, Smith KR, Norton DL, van Veelen W, Hoppener JW & Franklin DS. Simultaneous downregulation of CDK inhibitors p18(Ink4c) and p27(Kip1) is required for MEN2A-RET-mediated mitogenesis. *Oncogene* 2007 **26** 554–570. (doi:10.1038/sj.onc.1209811)
- Landa I, Montero-Conde C, Malanga D, De Gisi S, Pita G, Leandro-García LJ, Inglada-Perez L, Leton R, De Marco C, Rodríguez-Antona C *et al.* Allelic variant at –79 (C>T) in CDKN1B (P27Kip1) confers an increased risk of thyroid cancer and alters mRNA levels. *Endocrine-Related Cancer* 2010 **17** 317–328. (doi:10.1677/ERC-09-0016)
- Marinoni I & Pellegata NS. P27kip1: a new multiple endocrine neoplasia gene? *Neuroendocrinology* 2011 **93** 19–28. (doi:10.1159/000320366)
- Pasquali D, Circelli L, Faggiano A, Pancione M, Renzullo A, Elisei R, Romei C, Accardo G, Coppola VR, De Palma M *et al.* CDKN1B V109G polymorphism a new prognostic factor in sporadic medullary thyroid carcinoma. *European Journal of Endocrinology* 2011 **164** 397–404. (doi:10.1530/EJE-10-0929)
- van Veelen W, Klompaker R, Gloerich M, van Gasteren CJ, Kalkhoven E, Berger R, Lips CJ, Medema RH, Hoppener JW & Acton DS. P18 is a tumor suppressor gene involved in human medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma development. *International Journal of Cancer* 2009 **124** 339–345. (doi:10.1002/ijc.23977)
- Barbieri RB, Bufalo NE, Seolin R, Silva AC, Assumpcao LV, Maciel RM, Cerutti JM & Ward LS. Evidence that polymorphisms in detoxification genes modulate the susceptibility for sporadic medullary thyroid carcinoma. *European Journal of Endocrinology* 2012 **166** 241–245. (doi:10.1530/EJE-11-0843)
- Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, Moley JE, Pacini F, Ringel MD, Schlumberger M *et al.* Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2009 **19** 565–612. (doi:10.1089/thy.2008.0403)
- Tincani AJ, Teixeira GV, Tavares MR, Hojaij FC, Araújo PC, Mala AL, Ward LS, Kimura ET, Del Negro A, Friguglietti CUM *et al.* Cancer Medular de Tireoide – Tratamento. Diretrizes Clínicas na Saúde Suplementar 2011: http://www.projetodiretrizes.org.br/ans/diretrizes/cancer_medular_de_tireoide-tratamento.pdf.
- Costa-Guda J, Soong CP, Parekh VI, Agarwal SK & Arnold A. Germline and somatic mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes CDKN1A, CDKN2B, and CDKN2C in sporadic parathyroid adenomas. *Hormones & Cancer* 2013 **4** 301–307. (doi:10.1007/s12672-013-0147-9)
- Liu F, Wei YG, Luo LM, Wang WT, Yan LN, Wen TF, Xu MQ, Yang JY & Li B. Genetic variants of p21 and p27 and hepatocellular cancer risk in a Chinese Han population: a case-control study. *International Journal of Cancer* 2013 **132** 2056–2064. (doi:10.1002/ijc.27885)
- Tuna G, Kucukhuseyin O, Arkan S, Kaytan Saglam E, Guler E, Caciua C, Oztop O, Turan S, Korkmaz G & Yaylim I. Do CDKN2 p16 540 C>G, CDKN2 p16 580 C>T, and MDM2 SNP309 T>G gene variants act on colorectal cancer development or progression? *DNA and Cell Biology* 2013 **32** 400–408. (doi:10.1089/dna.2012.1933)
- Barrett JC, Fry B, Maller J & Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005 **21** 263–265. (doi:10.1093/bioinformatics/bth457)
- Hothorn T & Leisch F. Case studies in reproducibility. *Briefings in Bioinformatics* 2011 **12** 288–300. (doi:10.1093/bib/bbq084)
- Faul F, Erdfelder E, Lang AG & Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 2007 **39** 175–191. (doi:10.3758/BF03193146)
- Gayther SA, Song H, Ramus SJ, Kjaer SK, Whittemore AS, Quayle L, Tyrer J, Shadforth D, Hogdall E, Hogdall C *et al.* Tagging single nucleotide polymorphisms in cell cycle control genes and susceptibility to invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Research* 2007 **67** 3027–3035. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3261)
- Kibel AS, Suarez BK, Belani J, Oh J, Webster R, Brophy-Ebbers M, Guo C, Catalona WJ, Picus J & Goodfellow PJ. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Research* 2003 **63** 2033–2036.
- Li G, Sturgis EM, Wang LE, Chamberlain RM, Spitz MR, El-Naggar AK, Hong WK & Wei Q. Association between the V109G polymorphism of the p27 gene and the risk and progression of oral squamous cell

- carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2004 **10** 3996–4002. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0089)
- 29 Cave H, Martin E, Devaux I & Grandchamp B. Identification of a polymorphism in the coding region of the p27Kip1 gene. *Annales de Genetique* 1995 **38** 108.
 - 30 Figueiredo JC, Knight JA, Cho S, Savas S, Onay UV, Briollais L, Goodwin PJ, McLaughlin JR, Andrulis IL & Ozelik H. Polymorphisms cMyc-N11S and p27-V109G and breast cancer risk and prognosis. *BMC Cancer* 2007 **7** 99. (doi:10.1186/1471-2407-7-99)
 - 31 Wang Z, Sturgis EM, Zhang F, Lei D, Liu Z, Xu L, Song X, Wei Q & Li G. Genetic variants of p27 and p21 as predictors for risk of second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of head and neck. *Molecular Cancer* 2012 **11** 17. (doi:10.1186/1476-4598-11-17)
 - 32 Tomoda K, Kubota Y & Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature* 1999 **398** 160–165. (doi:10.1038/18230)
 - 33 Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Kaneda T, Sato S, Takekoshi T, Zhao M, Miyauchi M & Nikai H. p27Kip1 accumulation by inhibition of proteasome function induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Clinical Cancer Research* 2000 **6** 916–923.
 - 34 Driver KE, Song H, Lesueur F, Ahmed S, Barbosa-Morais NL, Tyrer JP, Ponder BA, Easton DF, Pharoah PD & Dunning AM. Association of single-nucleotide polymorphisms in the cell cycle genes with breast cancer in the British population. *Carcinogenesis* 2008 **29** 333–341. (doi:10.1093/carcin/bgm284)
 - 35 Thakur N, Hussain S, Nasare V, Das BC, Basir SF & Bharadwaj M. Association analysis of p16 (CDKN2A) and RB1 polymorphisms with susceptibility to cervical cancer in Indian population. *Molecular Biology Reports* 2012 **39** 407–414. (doi:10.1007/s11033-011-0752-z)
 - 36 Sherr CJ & Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development* 1999 **13** 1501–1512. (doi:10.1101/gad.13.12.1501)
 - 37 Chedid M, Michieli P, Lengel C, Huppi K & Givol D. A single nucleotide substitution at codon 31 (Ser/Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-inducible gene WAF1/CIP1. *Oncogene* 1994 **9** 3021–3024.
 - 38 Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM & Koff A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes and Development* 1994 **8** 9–22. (doi:10.1101/gad.8.1.9)
 - 39 Wang N, Wang S, Zhang Q, Lu Y, Wei H, Li W, Zhang S, Yin D & Ou Y. Association of p21 SNPs and risk of cervical cancer among Chinese women. *BMC Cancer* 2012 **12** 589. (doi:10.1186/1471-2407-12-589)
 - 40 Facher EA, Becich MJ, Deka A & Law JC. Association between human cancer and two polymorphisms occurring together in the p21Waf1/Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Cancer* 1997 **79** 2424–2429. (doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19970615)79:12<2424::AID-CNCR19>3.0.CO;2-T)
 - 41 Roh JW, Kim BK, Lee CH, Kim J, Chung HH, Kim JW, Park NH, Song YS, Park SY & Kang SB. P53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms and susceptibility to cervical adenocarcinoma in Korean women. *Oncology Research* 2010 **18** 453–459. (doi:10.3727/096504010X12671222663719)
 - 42 Ma H, Chen J, Pan S, Dai J, Jin G, Hu Z, Shen H & Shu Y. Potentially functional polymorphisms in cell cycle genes and the survival of non-small cell lung cancer in a Chinese population. *Lung Cancer* 2011 **73** 32–37. (doi:10.1016/j.lungcan.2010.11.001)
 - 43 Devlin B & Roeder K. Genomic control for association studies. *Biometrics* 1999 **55** 997–1004. (doi:10.1111/j.0006-341X.1999.00997.x)
 - 44 Bilguvar K, Yasuno K, Niemela M, Ruigrok YM, von Und Zu Fraunberg M, van Duijn CM, van den Berg LH, Mane S, Mason CE, Choi M *et al.* Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations. *Nature Genetics* 2008 **40** 1472–1477. (doi:10.1038/ng.240)
 - 45 Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Gretarsdottir S, Steinthorsdottir V, Manolescu A, Jones GT, Rinkel GJ, Blankensteijn JD, Ronkainen A *et al.* The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nature Genetics* 2008 **40** 217–224. (doi:10.1038/ng.72)
 - 46 Chen Z, Qian Q, Ma G, Wang J, Zhang X, Feng Y, Shen C & Yao Y. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of early-onset coronary artery disease. *Molecular Biology Reports* 2009 **36** 889–893. (doi:10.1007/s11033-008-9259-7)
 - 47 McPherson R, Pertsemilidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR *et al.* A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007 **316** 1488–1491. (doi:10.1126/science.1142447)
 - 48 Chang YC, Chiu YF, Liu PH, Shih KC, Lin MW, Sheu WH, Quertermous T, Curb JD, Hsiung CA, Lee WJ *et al.* Replication of genome-wide association signals of type 2 diabetes in Han Chinese in a prospective cohort. *Clinical Endocrinology* 2012 **76** 365–372. (doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04175.x)
 - 49 Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM *et al.* Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 2007 **316** 1336–1341. (doi:10.1126/science.1142364)
 - 50 Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, Dobbins SE, Sanson M, Malmer B, Simon M, Marie Y, Boisselier B, Delattre JY *et al.* Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nature Genetics* 2009 **41** 899–904. (doi:10.1038/ng.407)
 - 51 Uno S, Zembutsu H, Hirasawa A, Takahashi A, Kubo M, Akahane T, Aoki D, Kamatani N, Hirata K & Nakamura Y. A genome-wide association study identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nature Genetics* 2010 **42** 707–710. (doi:10.1038/ng.612)
 - 52 Pharoah PD, Dunning AM, Ponder BA & Easton DF. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nature Reviews. Cancer* 2004 **4** 850–860. (doi:10.1038/nrc1476)

Received 6 June 2014

Revised version received 5 September 2014

Accepted 2 October 2014

4.2. Pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Hereditário

O grupo de pacientes com CMTH foi composto de 67 homens e 71 mulheres com idades entre $35,80 \pm 17,82$ anos. Todos os polimorfismos estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$).

Em relação aos pacientes com CMTH e a comparação com os dados clínicos, encontramos relação do gene *CDKN1B* (rs34330) com idade de diagnóstico e tamanho de tumor, porém não encontramos associação com os genes *CDKN1B* (rs2066827), *CDKN2C* (rs12885) e *CDKN2A* (rs11515). (Tabela 6).

Polimorfismos x Dados clínicos	Gênero	Idade de diagnóstico	Calcitonina pré- operatória	Calcitonina pós- operatória	Recorrência local	Tempo livre de doença	Metástase à distância	Tamanho do tumor	Hiperplasia de célula C
<i>CDKN1B</i> (rs2066827)	0,308	2,611	0,641	2,145	3,13	3,76	0,068	3,437	4,144
<i>CDKN1B</i> (rs34330)	1,456	0,029*	2,186	0,183	1,513	2,927	0,133	0,044*	1,205
<i>CDKN2C</i> (rs12885)	1,398	0,712	1,842	2,679	0,275	0,95	0,241	1,859	0,383
<i>CDKN2A</i> (rs11515)	4,420	0,239	0,500	2,586	3,13	0,61	0,1	0,127	0,226

Tabela 6: Resultados de todos os polimorfismos estudados, em comparação com os dados clínicos analisados dos pacientes com CMTH. Os números em cada célula representam o valor de p de coluna respectiva associado com a linha.

*Associações marcadas estão mais bem descritas na figura 17 e na figura 18.

Com relação aos pacientes com CMTH verificou-se a influência do polimorfismo rs34330 do gene *CDKN1B* com o desenvolvimento da doença. A análise de regressão logística multivariada demonstrou que a herança do genótipo CT do polimorfismo rs34330 do gene *CDKN1B* (-79C> T), está relacionada com a agressividade do CMTH.

Pacientes heterozigotos (CT) apresentam tumores maiores ($1,4 \pm 1,38$ cm) do que pacientes polimórficos (TT - $0,6 \pm 0,65$ cm; $p = 0,044$), conforme Figura 17.

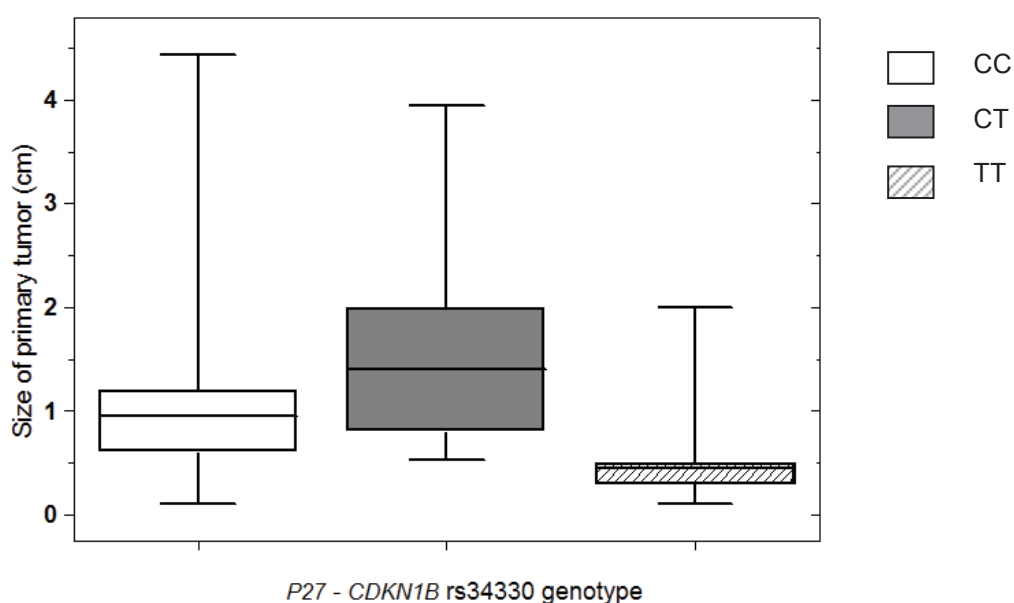


Figura 17: Comparação entre o tamanho do tumor primário e genotipagem do polimorfismo do gene *CDKN1B* em pacientes com carcinoma medular da tireoide hereditário (CMTH), através da análise de regressão logística multivariada.

Os pacientes com genótipo CC são mais jovens ($29,3 \pm 15,6$ anos de idade) do que os pacientes heterozigotos (CT - $42,1 \pm 18,2$ anos; $p = 0,029$), conforme detalhes na Figura 18.

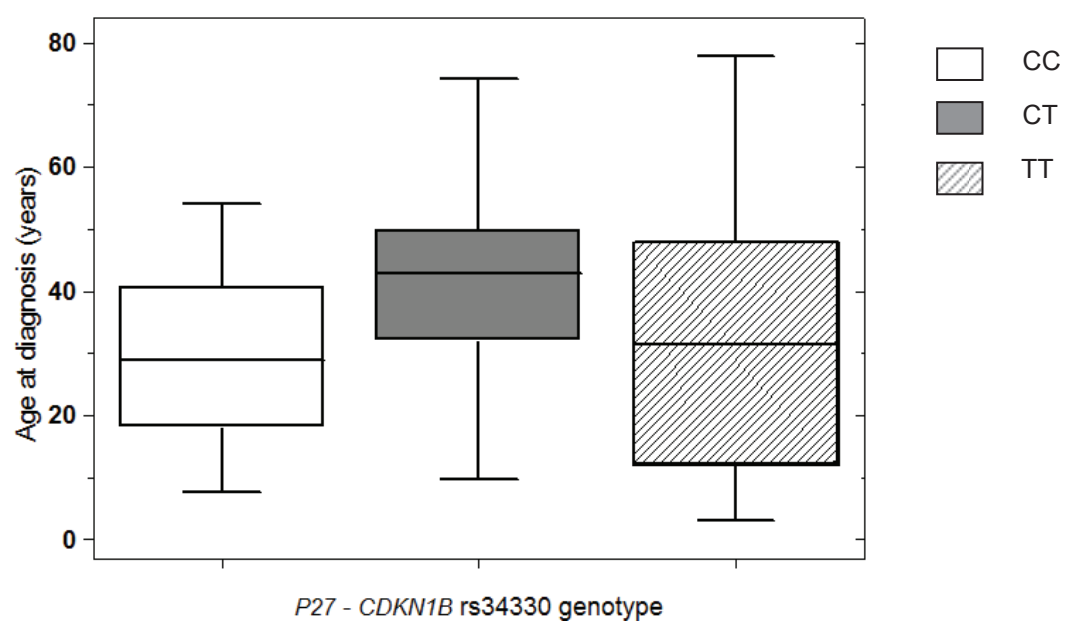


Figura 18: Comparação entre a idade de diagnóstico e genotipagem no gene *CDKN1B* de pacientes com carcinoma medular da tireoide hereditário (CMTH), através da análise de regressão logística multivariada.

5. DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro a investigar a associação de polimorfismos dos genes *CDKN1B*, *CDKN1A*, *CDKN2C*, *CDKN2A* e *CDKN2B* e a suscetibilidade ao CMT. Além da demonstração de que os genes *CDKN2A* e *CDKN1B* estão relacionados com a suscetibilidade ao CMT-s, este estudo também encontrou evidências de que variantes genéticas dos genes *CDKN1A*, *CDKN2B* e *CDKN2C* estão associados com características de agressividade do tumor. Da mesma forma, foi possível identificar relação do gene *CDKN1B* (rs34330) com idade de diagnóstico e tamanho de tumor para os pacientes com CMTH.

5.1 Pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Medular Esporádico

Estudos recentes têm demonstrado que os SNPs de genes que controlam o ciclo celular desempenham um papel importante na carcinogênese e podem conduzir a alterações na vulnerabilidade aos diferentes tipos de cânceres (67-69). Em nosso estudo, foi encontrada uma associação dos genes *CDKN1B* (rs2066827) e *CDKN2A* (rs11515) e a presença de CMT-s. Demonstramos que o genótipo GT+GG do polimorfismo rs2066827 do gene *CDKN1B* foi mais prevalente em pacientes com CMT-s, quando comparados com o grupo controle, aumentando a suscetibilidade ao desenvolvimento do tumor.

O polimorfismo V109G (rs2066827) substitui no códon 109 do gene *CDKN1B* uma Valina por uma Glicina (T> G) (100). A presença do alelo G do gene *CDKN1B* (rs2066827) tem sido associada a um risco aumentado para

desenvolvimento do câncer de tireoide (64, 69), da próstata e do câncer da mama (68, 101). No entanto, a associação deste polimorfismo a um melhor ou pior prognóstico ainda permanece incerto (64, 69, 102). Pasqualini e colaboradores também encontraram diferenças na frequência do tipo selvagem (TT - 53,6%) e alelos polimórficos (TG + GG - 46,4%) entre pacientes e controles ($p = 0,048$), sugerindo um risco da doença em indivíduos portadores do alelo polimórfico de rs2066827 do gene *CDKN1B* para pacientes com CMT-s (13). O polimorfismo V109G está inserido em uma região que interage fisicamente com a ativação da proteína, o que desencadeia a degradação proteolítica de p27 (103). De fato, uma redução da expressão de p27 tem sido associada com um pior prognóstico clínico em tumores da cabeça e pescoço (104). Além disso, tem sido demonstrado que as alterações de aminoácidos em torno da posição 108 deste gene, tais como os induzidos por polimorfismo V109G, podem reduzir a translocação de p27kip1. No entanto, nenhuma evidência ainda foi comprovada para apoiar a associação deste polimorfismo com a progressão do tumor em CMT (70).

Na população estudada, o alelo CG+GG do polimorfismo rs11515 do gene *CDKN2A* foi mais frequente no grupo controle do que nos pacientes com CMT-s, portanto, sugerimos que o mesmo possa apresentar um efeito protetor ao desenvolvimento de CMT-s. Polimorfismos do gene *CDKN2A* têm sido amplamente investigados em diferentes tipos de cânceres (105-107). O SNP (rs11515 - C98A) do gene *CDKN2A* determina uma substituição de Serina por uma Arginina localizado em 3'-UTR do éxon 3 (39). Da mesma forma que observamos para o polimorfismo rs11515 do gene *CDKN2A* nos pacientes com

CMT-s, o mesmo gene também foi considerado um fator protetor para o câncer cervical (106), pois este SNP pode afetar a ligação do DNA modificando, assim, a sua expressão e função (53).

No nosso estudo, encontramos também uma relação entre a agressividade do tumor e a presença de variantes dos genes *CDKN1A* (rs1801270), *CDKN2C* (rs12885) e *CDKN2B* (rs1063192).

Os pacientes que apresentaram a variante polimórfica (CA+AA) do gene *CDKN1A* (rs1801270) possuem extensão tumoral extratireoidiana com menor frequência, sugerindo que essa herança possa estar associada a um melhor prognóstico. Um estudo em câncer cervical na população chinesa também mostrou uma associação significativa entre o alelo polimórfico de rs1801270 para o gene *CDKN1A* e uma diminuição do risco da doença (108). Foi demonstrado que o polimorfismo rs1801270 do gene *CDKN1A* pode aumentar o risco de segunda neoplasia primária em pacientes com o índice de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (108). O SNP (rs1801270) no códon 31 do gene *CDKN1A* resulta na substituição de Arginina para Serina em uma região conservada da proteína e pode afetar a afinidade de ligação com o DNA e consequentemente, a sua função (51). A proteína p21 desempenha um papel na regulação do ciclo celular, ela se liga ao complexo ciclina-CDK para deter a progressão do ciclo celular em fase G1. A transcrição de p21 é parcialmente regulada por p53, que se liga ao promotor e induz a expressão de p21. Assim, alterações nos domínios funcionais, bem como na região promotora de p21 pode ser afetada pela presença do SNPs (109). O gene *CDKN1A* é frequentemente

desregulado em cânceres humanos, mas, dependendo do contexto celular pode atuar tanto como um supressor de tumoral como um oncogene (110).

O mecanismo molecular do possível efeito protetor dos genes *CDKN1A* (rs1801270) e *CDKN2C* (rs12885) no câncer não estão claros. O gene *CDKN2C*, está envolvido na regulação do ciclo celular, e se localiza no cromossomo 1p32. Um achado frequente em tumores de CMT, demonstrou que a perda de heterozigossidade no cromossomo 1p, pode classificá-lo como um potencial gene supressor tumoral. Estes dados sugerem que o gene *CDKN2C* possa agir como um supressor de tumor, dificultando o desenvolvimento do CMT (111).

Em relação ao polimorfismo do gene *CDKN2B* (rs1063192), encontramos metástases à distância apenas em pacientes polimórficos, sugerindo uma associação desse polimorfismo com a agressividade do tumor. O polimorfismo rs1063192 codifica o inibidor do gene *CDKN2B*, este gene também é um conhecido supressor de tumor associado com o retinoblastoma (Rb) (112). A região 9p21 do cromossomo foi considerada como um *locus hotspot* demonstrando associação com várias doenças, incluindo infarto do miocárdio (113-114), doença arterial coronariana (115), diabetes tipo 2 (116), glioma (117) e endometriose (118), porém não há relato de um possível efeito no câncer de tireoide.

5.2 Pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Hereditário

Este é o primeiro estudo de associação que investigou o papel de polimorfismos dos genes *CDKN1B*, *CDKN2C* e *CDKN2A* em CMTH. Foi possível verificar que a herança do polimorfismo rs34330 (-79C> T), localizado no gene *CDKN1B* foi associada com a agressividade da doença.

A perda de expressão da proteína p27Kip1 tem sido descrito como um evento frequente em vários cânceres humanos (119), e aparenta conferir uma vantagem proliferativa da célula cancerígena, podendo levar a formação de tumores. Este comportamento sugerido de supressor de tumoral de p27Kip1, ainda não se encaixa com todas as características clássicas, pois raramente é alterado em cânceres (41, 60-61). Este SNP está localizado na região 5' UTR, e é descrito como um "elemento rico em U" podendo se relacionar com fatores que comprometem a estabilidade do mRNA, durante a tradução (120). No entanto, a presença do polimorfismo rs34330 do gene *CDKN1B* também pode alterar a transcrição (64) e possivelmente estar envolvido em apoptose de células dendríticas (121). Wang e colaboradores propôs que devido à localização do SNP, o efeito funcional pode estar associado com uma reduzida produção da proteína p27Kip1 (89). Mutações de perda de função do gene têm sido descritas e podem contribuir para tumorigênese, pois sabemos que a perda do controle do ciclo celular é uma das marcas para o desenvolvimento do câncer (122-123). Em nossos dados, pudemos identificar uma diferença significativa relacionado com a presença do alelo C do polimorfismo rs34330 do gene *CDKN1B*, sugerindo uma maior agressividade relacionada a este alelo, provavelmente pelo fato do mesmo

estar localizado no 5'UTR e se associar com a baixa regulação do gene *CDKN1B* (124).

Estudo recente, demonstrou que o intervalo de tempo entre o nascimento e o primeiro tumor agressivo foi significativamente menor nos pacientes com o polimorfismo V109G no gene *CDKN1B*, do que nos doentes que não possuíam o polimorfismo ($p=0,03$). Da mesma forma, a idade avançada também esteve relacionada ao diagnóstico de NEM1 e a presença do primeiro tumor ($p = 0,02$), mas, em nosso estudo, não encontraram nenhuma relação com esse polimorfismo e a presença de NEM1(125).

CONCLUSÃO

Podemos concluir que os genes *CDKN1B* (rs2066827) e *CDKN2A* (rs11515) podem influenciar na suscetibilidade, enquanto que os genes *CDKN1A* (rs1801270) e *CDKN2C* (rs12885) se associaram com agressividade e *CDKN2B* (rs1063192) se relaciona com a proteção para o desenvolvimento do carcinoma medular de tireoide esporádico, e também podemos concluir que o gene *CDKN1B* (rs34330) influencia os fatores clínicos-patológicos para o desenvolvimento do carcinoma medular de tireoide hereditário.

Encontramos evidências de que alterações em alguns genes do ciclo celular estão associadas com a suscetibilidade e progressão do carcinoma medular de tireoide esporádico e hereditário. Sugere-se que as caracterizações de genes do ciclo celular possam auxiliar na identificação de fatores relacionados ao desenvolvimento do carcinoma medular de tireoide e possivelmente possam auxiliar na caracterização de agressividade do tumor.

REFERÊNCIAS

1. Burgess JR, Tucker P. Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine-needle aspirate cytology. *Thyroid*. 2006 Jan;16(1):47-53.
2. Veiga LH, Neta G, Aschebrook-Kilfoy B, Ron E, Devesa SS. Thyroid cancer incidence patterns in Sao Paulo, Brazil, and the U.S. SEER Program, 1997-2008. *Thyroid*. 2013 Jun;23(6):748-57.
3. Câncer I-INd. Incidência do Câncer no Brasil - Estimativa 2016. 2016; Available from: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/dados-apresentados.pdf>.
4. Golbert L, Wajner SM, Rocha AP, Maia AL, Gross JL. [Differentiated thyroid carcinoma: initial evaluation and follow-up]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005 Oct;49(5):701-10.
5. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):292-306.
6. Ward LS, Morari EC, Leite JL, Bufalo NE, Guilhen AC, Araujo PP, et al. Identifying a risk profile for thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Jul;51(5):713-22.
7. Wang CC, Friedman L, Kennedy GC, Wang H, Kebebew E, Steward DL, et al. A large multicenter correlation study of thyroid nodule cytopathology and histopathology. *Thyroid*. 2011 Mar;21(3):243-51.
8. Kilfoy BA, Zheng T, Holford TR, Han X, Ward MH, Sjodin A, et al. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. *Cancer Causes Control*. 2009 Jul;20(5):525-31.
9. Leboulleux S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004 Sep;61(3):299-310.
10. Raue F, Frank-Raue K, Grauer A. Multiple endocrine neoplasia type 2. Clinical features and screening. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1994 Mar;23(1):137-56.
11. Aschebrook-Kilfoy B, Ward MH, Sabra MM, Devesa SS. Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992-2006. *Thyroid*. 2011 Feb;21(2):125-34.
12. Kebebew E, Ituarte PH, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer*. 2000 Mar 1;88(5):1139-48.
13. Fagin JA. Perspective: lessons learned from molecular genetic studies of thyroid cancer--insights into pathogenesis and tumor-specific therapeutic targets. *Endocrinology*. 2002 Jun;143(6):2025-8.
14. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Jun;963:116-21.
15. Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*. 2009 Jun;19(6):565-612.
16. Romei C, Cosci B, Renzini G, Bottici V, Molinaro E, Agate L, et al. RET genetic screening of sporadic medullary thyroid cancer (MTC) allows the preclinical diagnosis of unsuspected gene carriers and the identification of a relevant percentage of hidden familial MTC (FMTC). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Feb;74(2):241-7.
17. Tamanaha R, Camacho CP, Pereira AC, da Silva AM, Maciel RM, Cerutti JM. Evaluation of RET polymorphisms in a six-generation family with G533C RET mutation: specific RET variants may modulate age at onset and clinical presentation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Jul;71(1):56-64.
18. Bufalo NE, Santos RB, Cury AN, Andrade RA, Morari J, Morari EC, et al. Genetic polymorphisms associated with cigarette smoking and the risk of Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Jun;68(6):982-7.

19. Cunha LL, Marcello MA, Morari EC, Nonogaki S, Conte FF, Gerhard R, et al. Differentiated thyroid carcinomas may elude the immune system by B7H1 upregulation. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Nov 28.
20. Cunha LL, Morari EC, Nonogaki S, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Foxp3 expression is associated with aggressiveness in differentiated thyroid carcinomas. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(5):483-8.
21. Cunha LL, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. The role of tumor-infiltrating lymphocytes in papillary thyroid carcinomas. *J Endocrinol Invest*. 2011 Oct;34(9):733.
22. Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpcao LV, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett*. 2004 Jul 16;210(2):151-7.
23. Guilhen AC, Bufalo NE, Morari EC, Leite JL, Assumpcao LV, Tincani AJ, et al. Role of the N-acetyltransferase 2 detoxification system in thyroid cancer susceptibility. *Clin Cancer Res*. 2009 Jan 1;15(1):406-12.
24. Marcello MA, Morari EC, Ward LS. P53 protein profile by IHC may be helpful to define patient prognosis. *Med Oncol*. 2012 Jun 22.
25. Bufalo NE, Leite JL, Guilhen AC, Morari EC, Granja F, Assumpcao LV, et al. Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Dec;13(4):1185-93.
26. Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpcao LV, Ward LS. GST profiling may be useful in the screening for thyroid nodule malignancy. *Cancer Lett*. 2004 Jun 25;209(2):129-37.
27. Machida YJ, Hamlin JL, Dutta A. Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell*. 2005 Oct 7;123(1):13-24.
28. Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Jan;2(1):21-32.
29. Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 2004 Nov 15;18(22):2699-711.
30. Planas-Silva MD, Weinberg RA. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Dec;9(6):768-72.
31. Zetterberg A, Larsson O. Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Aug;82(16):5365-9.
32. Blow JJ, Hodgson B. Replication licensing--defining the proliferative state? *Trends Cell Biol*. 2002 Feb;12(2):72-8.
33. Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, Thomas GA, Romanov S, Bobrow L, et al. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci*. 2001 Jun;114(Pt 11):2027-41.
34. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet*. 2009 Aug 1;374(9687):362-5.
35. Goode EL, Fridley BL, Vierkant RA, Cunningham JM, Phelan CM, Anderson S, et al. Candidate gene analysis using imputed genotypes: cell cycle single-nucleotide polymorphisms and ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Mar;18(3):935-44.
36. Rakoff-Nahoum S. Why cancer and inflammation? *Yale J Biol Med*. 2006 Dec;79(3-4):123-30.
37. Cordon-Cardo C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol*. 1995 Sep;147(3):545-60.
38. MacLachlan TK, Sang N, Giordano A. Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1995;5(2):127-56.
39. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999 Jun 15;13(12):1501-12.

40. Ward LS, Assumpcao LV. [Thyroid cancer: prognostic factors and treatment]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004 Feb;48(1):126-36.
41. Krimpenfort P, Ijpenberg A, Song JY, van der Valk M, Nawijn M, Zevenhoven J, et al. p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature.* 2007 Aug 23;448(7156):943-6.
42. Wiedemeyer R, Brennan C, Heffernan TP, Xiao Y, Mahoney J, Protopopov A, et al. Feedback circuit among INK4 tumor suppressors constrains human glioblastoma development. *Cancer Cell.* 2008 Apr;13(4):355-64.
43. Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract.* 2004 Dec;58(12):1134-41.
44. Neta G, Brenner AV, Sturgis EM, Pfeiffer RM, Hutchinson AA, Aschebrook-Kilfoy B, et al. Common genetic variants related to genomic integrity and risk of papillary thyroid cancer. *Carcinogenesis.* 2011 Aug;32(8):1231-7.
45. Zafon C, Obiols G, Castellvi J, Ramon y Cajal S, Baena JA, Mesa J. Expression of p21cip1, p27kip1, and p16Ink4a cyclin-dependent kinase inhibitors in papillary thyroid carcinoma: correlation with clinicopathological factors. *Endocr Pathol.* 2008 Fall;19(3):184-9.
46. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 1994 Mar 1;54(5):1169-74.
47. Erber R, Klein W, Andl T, Enders C, Born AI, Conradt C, et al. Aberrant p21(CIP1/WAF1) protein accumulation in head-and-neck cancer. *Int J Cancer.* 1997 Aug 22;74(4):383-9.
48. Jiang M, Shao ZM, Wu J, Lu JS, Yu LM, Yuan JD, et al. p21/waf1/cip1 and mdm-2 expression in breast carcinoma patients as related to prognosis. *Int J Cancer.* 1997 Oct 21;74(5):529-34.
49. Shiohara M, el-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, et al. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood.* 1994 Dec 1;84(11):3781-4.
50. Sun Y, Hildesheim A, Li H, Li Y, Chen JY, Cheng YJ, et al. No point mutation but a codon 31ser-->arg polymorphism of the WAF-1/CIP-1/p21 tumor suppressor gene in nasopharyngeal carcinoma (NPC): the polymorphism distinguishes Caucasians from Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995 Apr-May;4(3):261-7.
51. Facher EA, Becich MJ, Deka A, Law JC. Association between human cancer and two polymorphisms occurring together in the p21Waf1/Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Cancer.* 1997 Jun 15;79(12):2424-9.
52. Mousses S, Ozcelik H, Lee PD, Malkin D, Bull SB, Andrulis IL. Two variants of the CIP1/WAF1 gene occur together and are associated with human cancer. *Hum Mol Genet.* 1995 Jun;4(6):1089-92.
53. Chedid M, Michieli P, Lengel C, Huppi K, Givol D. A single nucleotide substitution at codon 31 (Ser/Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-inducible gene WAF1/CIP1. *Oncogene.* 1994 Oct;9(10):3021-4.
54. Chen WC, Wu HC, Hsu CD, Chen HY, Tsai FJ. p21 gene codon 31 polymorphism is associated with bladder cancer. *Urol Oncol.* 2002 Mar-Apr;7(2):63-6.
55. Lukas J, Groshen S, Saffari B, Niu N, Reles A, Wen WH, et al. WAF1/Cip1 gene polymorphism and expression in carcinomas of the breast, ovary, and endometrium. *Am J Pathol.* 1997 Jan;150(1):167-75.
56. Savas S, Ahmad MF, Shariff M, Kim DY, Ozcelik H. Candidate nsSNPs that can affect the functions and interactions of cell cycle proteins. *Proteins.* 2005 Feb 15;58(3):697-705.
57. Kanopka A, Muhlemann O, Akusjarvi G. Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature.* 1996 Jun 6;381(6582):535-8.

58. Simard MJ, Chabot B. SRp30c is a repressor of 3' splice site utilization. *Mol Cell Biol.* 2002 Jun;22(12):4001-10.
59. Sa G, Guo Y, Stacey DW. The regulation of S phase initiation by p27Kip1 in NIH3T3 cells. *Cell Cycle.* 2005 Apr;4(4):618-27.
60. Kossatz U, Malek NP. p27: tumor suppressor and oncogene ...? *Cell Res.* 2007 Oct;17(10):832-3.
61. Lindberg D, Akerstrom G, Westin G. Mutational analysis of p27 (CDKN1B) and p18 (CDKN2C) in sporadic pancreatic endocrine tumors argues against tumor-suppressor function. *Neoplasia.* 2007 Jul;9(7):533-5.
62. Ito E, Iwahashi Y, Yanagisawa Y, Suzuki Y, Sugano S, Yuasa Y, et al. Two short sequences have positive effects on the human p27Kip1 gene transcription. *Gene.* 1999 Mar 4;228(1-2):93-100.
63. Khoo ML, Beasley NJ, Ezzat S, Freeman JL, Asa SL. Overexpression of cyclin D1 and underexpression of p27 predict lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Apr;87(4):1814-8.
64. Landa I, Montero-Conde C, Malanga D, De Gisi S, Pita G, Leandro-Garcia LJ, et al. Allelic variant at -79 (C>T) in CDKN1B (p27Kip1) confers an increased risk of thyroid cancer and alters mRNA levels. *Endocr Relat Cancer.* 2010 Jun;17(2):317-28.
65. Liu Z, Dong Z, Han B, Yang Y, Liu Y, Zhang JT. Regulation of expression by promoters versus internal ribosome entry site in the 5'-untranslated sequence of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(12):3763-71.
66. Minami S, Ohtani-Fujita N, Igata E, Tamaki T, Sakai T. Molecular cloning and characterization of the human p27Kip1 gene promoter. *FEBS Lett.* 1997 Jul 7;411(1):1-6.
67. Gayther SA, Song H, Ramus SJ, Kjaer SK, Whittemore AS, Quaye L, et al. Tagging single nucleotide polymorphisms in cell cycle control genes and susceptibility to invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 2007 Apr 1;67(7):3027-35.
68. Kibel AS, Suarez BK, Belani J, Oh J, Webster R, Brophy-Ebbers M, et al. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Res.* 2003 May 1;63(9):2033-6.
69. Li G, Sturgis EM, Wang LE, Chamberlain RM, Spitz MR, El-Naggar AK, et al. Association between the V109G polymorphism of the p27 gene and the risk and progression of oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):3996-4002.
70. Pasquali D, Circelli L, Faggiano A, Pancione M, Renzullo A, Elisei R, et al. CDKN1B V109G polymorphism a new prognostic factor in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2011 Mar;164(3):397-404.
71. Debniak T, Scott RJ, Huzarski T, Byrski T, Rozmiarek A, Debniak B, et al. CDKN2A common variant and multi-organ cancer risk--a population-based study. *Int J Cancer.* 2006 Jun 15;118(12):3180-2.
72. Macaluso M, Montanari M, Cinti C, Giordano A. Modulation of cell cycle components by epigenetic and genetic events. *Semin Oncol.* 2005 Oct;32(5):452-7.
73. Zhang HS, Postigo AA, Dean DC. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell.* 1999 Apr 2;97(1):53-61.
74. Whelan AJ, Bartsch D, Goodfellow PJ. Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med.* 1995 Oct 12;333(15):975-7.
75. Haluska FG, Tsao H, Wu H, Haluska FS, Lazar A, Goel V. Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr 1;12(7 Pt 2):2301s-7s.

76. Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, et al. Main roads to melanoma. *J Transl Med.* 2009;7:86.
77. Wikman H, Kettunen E. Regulation of the G1/S phase of the cell cycle and alterations in the RB pathway in human lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006 Apr;6(4):515-30.
78. Li J, Poi MJ, Tsai MD. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. *Biochemistry.* 2011 Jun 28;50(25):5566-82.
79. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.* 2003 Feb;13(2):65-70.
80. Sauroja I, Smeds J, Vlaykova T, Kumar R, Talve L, Hahka-Kemppinen M, et al. Analysis of G(1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000 Aug;28(4):404-14.
81. Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, et al. CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Mar 3;91(5):446-52.
82. Fargnoli MC, Chimenti S, Keller G, Soyer HP, Dal Pozzo V, Hofler H, et al. CDKN2a/p16INK4a mutations and lack of p19ARF involvement in familial melanoma kindreds. *J Invest Dermatol.* 1998 Dec;111(6):1202-6.
83. Cunnington MS, Santibanez Koref M, Mayosi BM, Burn J, Keavney B. Chromosome 9p21 SNPs Associated with Multiple Disease Phenotypes Correlate with ANRIL Expression. *PLoS Genet.* 2010 Apr;6(4):e1000899.
84. Landi D, Gemignani F, Barale R, Landi S. A catalog of polymorphisms falling in microRNA-binding regions of cancer genes. *DNA Cell Biol.* 2008 Jan;27(1):35-43.
85. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Oct;2(10):731-7.
86. Mazumder B, Sampath P, Seshadri V, Maitra RK, DiCorleto PE, Fox PL. Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell.* 2003 Oct 17;115(2):187-98.
87. Conne B, Stutz A, Vassalli JD. The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med.* 2000 Jun;6(6):637-41.
88. Guhaniyogi J, Brewer G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene.* 2001 Mar 7;265(1-2):11-23.
89. Wang W, Spitz MR, Yang H, Lu C, Stewart DJ, Wu X. Genetic variants in cell cycle control pathway confer susceptibility to lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Oct 1;13(19):5974-81.
90. Harismendy O, Notani D, Song X, Rahim NG, Tanasa B, Heintzman N, et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response. *Nature.* 2011 Feb 10;470(7333):264-8.
91. Driver KE, Song H, Lesueur F, Ahmed S, Barbosa-Morais NL, Tyrer JP, et al. Association of single-nucleotide polymorphisms in the cell cycle genes with breast cancer in the British population. *Carcinogenesis.* 2008 Feb;29(2):333-41.
92. Arendt T, Rodel L, Gartner U, Holzer M. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 1996 Nov 25;7(18):3047-9.
93. Latres E, Malumbres M, Sotillo R, Martin J, Ortega S, Martin-Caballero J, et al. Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J.* 2000 Jul 3;19(13):3496-506.
94. Zindy F, van Deursen J, Grosveld G, Sherr CJ, Roussel MF. INK4d-deficient mice are fertile despite testicular atrophy. *Mol Cell Biol.* 2000 Jan;20(1):372-8.
95. Bai F, Pei XH, Pandolfi PP, Xiong Y. p18 Ink4c and Pten constrain a positive regulatory loop between cell growth and cell cycle control. *Mol Cell Biol.* 2006 Jun;26(12):4564-76.

96. Gonzalez-Gonzalez A, Mate-Valdezate A, Parra-Arroyo A, Tenias-Burillo JM. New guidelines for the management of thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Minerva Endocrinol.* 2011 Mar;36(1):7-12.
97. Paz-Filho G, Graf H, Ward LS. Comparative analysis of the new guidelines and consensuses for the management of hypothyroidism, thyroid nodules, and differentiated thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013 Jun;57(4):233-9.
98. Nakabashi CC, Guimaraes GS, Michaluart P, Jr., Ward LS, Cerutti JM, Maciel RM. The expression of PAX8-PPARgamma rearrangements is not specific to follicular thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 Aug;61(2):280-2.
99. De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. *Mutat Res.* 2005 Jun 3;573(1-2):111-35.
100. Cave H, Martin E, Devaux I, Grandchamp B. Identification of a polymorphism in the coding region of the p27Kip1 gene. *Ann Genet.* 1995;38(2):108.
101. Figueiredo JC, Knight JA, Cho S, Savas S, Onay UV, Briollais L, et al. Polymorphisms cMyc-N11S and p27-V109G and breast cancer risk and prognosis. *BMC Cancer.* 2007;7:99.
102. Liu F, Wei YG, Luo LM, Wang WT, Yan LN, Wen TF, et al. Genetic variants of p21 and p27 and hepatocellular cancer risk in a Chinese Han population: a case-control study. *Int J Cancer.* 2013 May 1;132(9):2056-64.
103. Tomoda K, Kubota Y, Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature.* 1999 Mar 11;398(6723):160-5.
104. Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Kaneda T, Sato S, Takekoshi T, et al. p27Kip1 accumulation by inhibition of proteasome function induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2000 Mar;6(3):916-23.
105. Costa-Guda J, Soong CP, Parekh VI, Agarwal SK, Arnold A. Germline and somatic mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes CDKN1A, CDKN2B, and CDKN2C in sporadic parathyroid adenomas. *Horm Cancer.* 2013 Oct;4(5):301-7.
106. Thakur N, Hussain S, Nasare V, Das BC, Basir SF, Bhargadwaj M. Association analysis of p16 (CDKN2A) and RB1 polymorphisms with susceptibility to cervical cancer in Indian population. *Mol Biol Rep.* 2012 Jan;39(1):407-14.
107. Tuna G, Kucukhuseyin O, Arikan S, Kaytan Saglam E, Guler E, Cacina C, et al. Do CDKN2 p16 540 C>G, CDKN2 p16 580 C>T, and MDM2 SNP309 T>G gene variants act on colorectal cancer development or progression? *DNA Cell Biol.* 2013 Jul;32(7):400-8.
108. Wang N, Wang S, Zhang Q, Lu Y, Wei H, Li W, et al. Association of p21 SNPs and risk of cervical cancer among Chinese women. *BMC Cancer.* 2012;12:589.
109. Roh JW, Kim BK, Lee CH, Kim J, Chung HH, Kim JW, et al. P53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms and susceptibility to cervical adenocarcinoma in Korean women. *Oncol Res.* 2010;18(9):453-9.
110. Ma H, Chen J, Pan S, Dai J, Jin G, Hu Z, et al. Potentially functional polymorphisms in cell cycle genes and the survival of non-small cell lung cancer in a Chinese population. *Lung Cancer.* 2011 Jul;73(1):32-7.
111. Santarpia L, Ye L, Gagel RF. Beyond RET: potential therapeutic approaches for advanced and metastatic medullary thyroid carcinoma. *J Intern Med.* 2009 Jul;266(1):99-113.
112. Devlin B, Roeder K. Genomic control for association studies. *Biometrics.* 1999 Dec;55(4):997-1004.
113. Bilguvar K, Yasuno K, Niemela M, Ruigrok YM, von Und Zu Fraunberg M, van Duijn CM, et al. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations. *Nat Genet.* 2008 Dec;40(12):1472-7.

114. Helgadóttir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Gretarsdóttir S, Steinthorsdóttir V, Manolescu A, et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet.* 2008 Feb;40(2):217-24.
115. Chen Z, Qian Q, Ma G, Wang J, Zhang X, Feng Y, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of early-onset coronary artery disease. *Mol Biol Rep.* 2009 May;36(5):889-93.
116. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science.* 2007 Jun 1;316(5829):1336-41.
117. Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, Dobbins SE, Sanson M, Malmer B, et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet.* 2009 Aug;41(8):899-904.
118. Uno S, Zembutsu H, Hirasawa A, Takahashi A, Kubo M, Akahane T, et al. A genome-wide association study identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nat Genet.* 2010 Aug;42(8):707-10.
119. Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol.* 2000 Apr;183(1):10-7.
120. Millard SS, Vidal A, Markus M, Koff A. A U-rich element in the 5' untranslated region is necessary for the translation of p27 mRNA. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug;20(16):5947-59.
121. Lu C, Huang X, Zhang X, Roensch K, Cao Q, Nakayama KI, et al. miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1, and SOCS-1. *Blood.* 2011 Apr 21;117(16):4293-303.
122. Fearon E. The sweet secrets of p27kip1 regulation and function in cell migration. *Cell Cycle.* 2011 Oct 15;10(20):3429.
123. Itamochi H, Yoshida T, Walker CL, Bartholomeusz C, Aoki D, Ishihara H, et al. Novel mechanism of reduced proliferation in ovarian clear cell carcinoma cells: cytoplasmic sequestration of CDK2 by p27. *Gynecol Oncol.* 2011 Sep;122(3):641-7.
124. Yang W, Tang H, Zhang Y, Tang X, Zhang J, Sun L, et al. Meta-analysis followed by replication identifies loci in or near CDKN1B, TET3, CD80, DRAM1, and ARID5B as associated with systemic lupus erythematosus in Asians. *Am J Hum Genet.* 2013 Jan 10;92(1):41-51.
125. Circelli L, Ramundo V, Marotta V, Sciammarella C, Marciello F, Del Prete M, et al. Prognostic role of the CDKN1B V109G polymorphism in multiple endocrine neoplasia type 1. *J Cell Mol Med.* 2015 Jul;19(7):1735-41.

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer Comitê de Ética – UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 13/01/12
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1088/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0987.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DO PAPEL DE DIFERENÇAS NO PERFIL DE GENES DE REPARO E DE APOPTOSE NA SUSCETIBILIDADE TEMPORAL AO DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIREÓIDE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Raquel Bueno Barbieri

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/10/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 13/01/13 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II – OBJETIVOS.

Investigar o papel de polimorfismos dos genes ATM, TP53, XRCC1, XRCC3, MTF1, FOXE1 e NKX2-1, Fas e FasL no desenvolvimento do câncer diferenciado da tireóide (CDT), correlacionando a sua presença a características clínicas, morfológicas e moleculares dos CDT e com o tempo de doença, além de comparar com os níveis séricos de THS, T3 e T4.

III – SUMÁRIO.

Serão avaliados 300 pacientes portadores de CDT, na proporção de 2 a 3 mulheres para cada homem, com idades variadas, incluindo menores de idade, que estejam em acompanhamento no ambulatório de câncer de tireóide da disciplina de Endocrinologia da FCM/UNICAMP. Para a investigação de polimorfismos genéticos serão utilizadas amostras de sangue que já seriam rotineiramente colhidas para realização de outros exames laboratoriais. Os pacientes serão divididos em 2 grupos: o primeiro com CDT há mais de 5, 10 e 15 anos e o segundo, há menos de 5 anos. Será ainda utilizado um grupo controle de 400 indivíduos da mesma região, pareados por sexo, idade, etnia e exposição a fatores de risco ambiental. Após a coleta de sangue e extração do DNA, este será estocado em freezer -20 graus. Para a realização do estudo os pesquisadores já dispõem de equipamentos e de conhecimento técnico. Solicitam, no entanto, verba à FAPESP para aquisição de reagentes e material de consumo, no valor total de R\$74.436,40. Os pesquisadores incluem 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sendo um para o grupo de estudo e outro para grupo controle, ambos contemplando eventual autorização de pais ou responsáveis, já que menores de idade farão parte do estudo.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

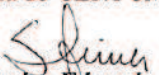
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de outubro de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
 PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 FCM / UNICAMP



Comitê de Ética Em Pesquisa
Universidade Estadual de Campinas

<http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa/comite-de-etica-em-pesquisa>

CEP, 25/03/14.
(PARECER CEP: Nº 1088/2011)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DO PAPEL DE DIFERENÇAS NO PERFIL DE GENES DE REPARO E DE APOPTOSE NA SUSCETIBILIDADE TEMPORAL AO DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA PAPILÍFERO NA TIREOIDE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Raquel Bueno Barbieri

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprova a alteração do título para “**PAPEL DOS POLIMORFISMOS DE GENES CONTROLADORES DO CICLO CELULAR NO CÂNCER DA TIREOIDE**”, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de março de 2014.


Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz
COORDENADORA do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



CEP, 26/02/16.
(PARECER CEP: Nº 1088/2011)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DO PAPEL DE DIFERENÇAS NO PERFIL DE GENES DE REPARO E DE APOPTOSE NA SUSCETIBILIDADE TEMPORAL AO DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA PAPILÍFERO NA TIREÓIDE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Raquel Bueno Barbieri

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) aprovou a alteração de título da emenda ao projeto, antes intitulado “PAPEL DOS POLIMORFISMOS DE GENES CONTROLADORES DO CICLO CELULAR NO CÂNCER DE TIREÓIDE”, modificando-o para “ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DE GENES CONTROLADORES DO CICLO CELULAR NO CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE”, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.


III – DATA DA REUNIÃO.

Aprovado “Ad-referendum” no dia 26 de fevereiro de 2016.

A ser homologado na II Reunião Ordinária do CEP/UNICAMP, em 22 de março de 2016.


Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP

ANEXO 2 – Parecer Comitê de Ética – UNFESP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Nº Comitê Ética

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 15 de junho de 2007
CEP 1749/06

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) RUI MONTEIRO DE BARROS MACIEL

Co-Investigadores: Janete M Cerutti, Magnus R Dias da Silva, José Gilberto H Vieira, Teresa S Kasamatsu, Angela M Faria

Disciplina/Departamento: Endocrinologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Carcinoma medular da tireóide: revisão à clínica, à biologia molecular, à bioquímica e à biologia do desenvolvimento depois dos achados da genética molecular".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: estudo de centro único, com colaboração de 15 centros brasileiros.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: risco médio, desconforto moderado, envolvendo coleta de sangue, biópsias de tecidos e cirurgia quando indicada.

OBJETIVOS: Realizar uma abordagem multi-disciplinar e ampliada para o estudo do carcinoma medular da tireóide (MTC), realizando estudos clínicos, bioquímicos, moleculares e de biologia do desenvolvimento..

RESUMO: Estudo de centro único, com colaboração de 15 centros brasileiros. Projeto temático, envolvendo 8 sub-projetos: Subprojeto 1- Desenvolver o consórcio brasileiro para o diagnóstico genético do carcinoma medular da tireóide e das síndrome de neoplasia endócrina múltiplas do tipo 2 (MEN2A, MEN2B) (BRASMEN). Neste projeto, pretende-se organizar um consórcio brasileiro para o diagnóstico genético do carcinoma medular da tireóide e das síndromes de neoplasia endócrina múltiplas do tipo 2, juntando grupos acadêmicos com mais experiência e maior casuística. Subprojeto 2- Caracterizar o quadro clínico completo dos pacientes com carcinoma medular de tireóide da família com mutação G533C. Subprojeto 3-Descrever as características anátomo-patológicas dos tecidos tireoidianos dos pacientes com carcinoma medular de tireóide da família com mutação G533C. Subprojeto 4- Desenvolver um ensaio sensível e específico de calcitonina para o diagnóstico e o seguimento dos pacientes com MTC e MEN2 do consórcio BRASMEN. Subprojeto 5- Caracterizar polimorfismos do gene RET na população brasileira com MEN2A, MEN2B e FMTC do consórcio BRASMEN e determinar suas relações com a expressão da doença. Subprojeto 6- Validar funcionalmente mutações novas do gene RET da população brasileira com MEN2A, MEN2B e FMTC do consórcio BRASMEN. Subprojeto 7- Estabelecer um modelo embrionário de tumorigênese tireoidiana em embrião de galinha através da técnica de transgênese somática para estudo do desenvolvimento do MTC in vivo. Subprojeto 8- Estudar a expressão de glicosaminoglicanos e proteoglicanos em linhagens celulares e em tecidos tireoidianos de carcinoma medular da tireóide..

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo fundamentado, visando realizar um consórcio multidisciplinar nacional para o estudo do carcinoma medular da tireóide. O projeto é constituído por 8 subprojetos, analisando aspectos clínicos, bioquímicos, moleculares e de biologia do desenvolvimento..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos de cada subprojeto, envolvendo grande equipe multidisciplinar.

TCLE: Adequado, contemplando a resolução 196/96.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP.

CRONOGRAMA: 48 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: mestrado/doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 14/6/2008 e 14/6/2009.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Apresentar ao CEP a carta de aprovação do CTNBio e novo TCLE com o endereço e telefone do CEP-Unifesp

ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Controles



LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa em Câncer de Tireóide

Pesquisadora: Profª Dra Laura Sterian Ward / Profª Dra Lígia Vera Montalli Assumpção

Doador – indivíduo **controle**

Sr(a) _____ Anos _____
 RG: _____ HC: _____
 Endereço: _____
 Telefone: _____ Data: / /

Concordo em doar 9 mL de sangue para pesquisa de ácidos nucleicos e proteínas que podem estar envolvidas em doenças malignas e benignas da tireóide. A pesquisa tem por objetivo a melhor compreensão dos fatores moleculares de diagnóstico e prognóstico, fazendo comparação entre indivíduos doentes e saudáveis. Tal pesquisa justifica-se dada a importância da compreensão destes fatores para o tratamento dos pacientes. Sei que se trata de uma pesquisa científica e concordo em que os meus dados, registrados no meu prontuário médico, sejam utilizados na pesquisa, sabendo que meu nome assim como meus dados clínicos e de laboratório não serão individualmente citados e que em nenhum momento serei prejudicado por tal doação. Meus dados e o material biológico advindo da coleta poderão ser usados em novas pesquisas relacionadas ao câncer de tireóide, caso justificativa devida, sendo estas pesquisas aprovadas devidamente pelo CEP e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, submissas totalmente à devida legislação. A cada nova pesquisa em que meu material será utilizado, receberei um novo termo de consentimento (pelo correio) para autorizar a utilização do material doado. Tenho a garantia de sigilo de dados confidenciais ou que, de algum modo, possam me provocar constrangimentos ou prejuízos, tornando anônimo o material ou dados obtidos. Também sei que esta pesquisa pode trazer benefícios para a cura ou tratamento das doenças tireoidianas no futuro. Não terei nenhuma forma de reembolso, já que não terei nenhum gasto com a doação do meu material para esta pesquisa e sei que poderei cancelar minha decisão e deixar de participar em qualquer momento. Também não serei submetido a qualquer procedimento que não faça parte da rotina de doação de sangue, sob a orientação da equipe de enfermagem. Estou consciente da importância de minha participação da qual posso desistir em qualquer momento. Fui informado de que este projeto está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e sei que poderei obter todas as informações que desejar e necessitar no contato ao CEP (infratado), bem como denunciar quaisquer procedimentos que infrinjam as normas do CEP. Poderei obter esclarecimentos antes, durante e depois da realização da pesquisa sobre a mesma, contatando a pesquisadora responsável Profa, Dra, Laura S, Ward no contato abaixo. Autorizo a guarda do material biológico para fins de pesquisas futuras? () Sim () Não

 Assinatura do Paciente ou Responsável pelo Paciente

Profª Dra, Laura Sterian Ward: Coordenadora do GEMOCA- Clínica Médica/ FCM-UNICAMP, CEP:13081-970, Campinas, SP, (19) 3521-8954, e-mail:ward@unicamp.br. CEP: Fone: (19) 3521-8938, Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP, e-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes



LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa em Câncer de Tireóide

Pesquisadora: Profª Dra Laura Sterian Ward e Profª Dra Lígia Vera Montalli Assumpção

Paciente ou Responsável pelo paciente

Sr(a) _____ Anos _____

RG: _____ HC: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Data: / /

Concordo em doar sangue e tecido para pesquisa de ácidos nucléicos e proteínas que podem estar envolvidas em doenças malignas e benignas da tireóide, A pesquisa tem por objetivo a melhor compreensão dos fatores moleculares de diagnóstico e prognóstico, Tal pesquisa justifica-se dada a importância da compreensão destes fatores para o tratamento dos pacientes, Sei que se trata de uma pesquisa científica e concordo em que os dados de meu caso, registrados no meu prontuário médico, sejam utilizados na pesquisa, sabendo que meu nome assim como meus dados clínicos e de laboratório não serão individualmente citados e que em nenhum momento meu diagnóstico ou tratamento serão prejudicados por tal doação, Meus dados e o material biológico advindo da coleta poderão ser usados em novas pesquisas, caso justificativa devida, sendo estas pesquisas aprovadas devidamente pelo CEP e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, submissas totalmente à devida legislação, Tenho a garantia de sigilo de dados confidenciais ou que, de algum modo, possam me provocar constrangimentos ou prejuízos, tornando anônimo o material ou dados obtidos, Também sei que esta pesquisa pode trazer benefícios para a cura ou tratamento das doenças tireoidianas no futuro, mesmo que eu não me beneficie disso agora, Não terei nenhuma forma de reembolso, já que não terei nenhum gasto com a doação do meu material para esta pesquisa e sei que poderei cancelar minha decisão e deixar de participar em qualquer momento, Também não serei submetido a qualquer procedimento que não faça parte da rotina de meu tratamento normal, sob a orientação de meu médico habitual, Estou consciente da importância de minha participação da qual posso desistir em qualquer momento, Fui informado de que este projeto está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e sei que poderei obter todas as informações que desejar e necessitar no contato ao CEP (infracitado), bem como denunciar quaisquer procedimentos que infrinjam as normas do CEP, Poderei obter esclarecimentos antes, durante e depois da realização da pesquisa sobre a mesma, contatando a pesquisadora responsável Profa, Dra, Laura S, Ward no contato abaixo,

Autorizo a guarda do material biológico para fins de pesquisas futuras? () Sim () Não

 Assinatura do Paciente ou Responsável pelo Paciente Profª Dra, Laura Sterian Ward:
 Coordenadora do GEMOCA- Clínica Médica/ FCM-UNICAMP, CEP:13081-970, Campinas, SP,
 (19) 3521-8954, e-mail:ward@unicamp,BR CEP: Fone: (19) 3521-8938, Caixa Postal 6111, 13083-
 970 Campinas, SP, e-mail: cep@fcm,unicamp,BR

ANEXO 5 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da UNIFESP



Diagnóstico Molecular Ampliado do Carcinoma Medular de Tiróide

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Voluntário: _____ Idade: _____ (anos)

Investigador Principal: Dr, Rui M, B, Maciel

Co-investigadores: Dr^a Rosa Paula M, Biscolla, Dr^a Janete M, Cerutti, Dr, Magnus R, Dias da Silva, Dr, João Roberto M, Martins, Dr, Cléber P, Camacho e Dr^a Danielle Andreoni,

Pesquisadores envolvidos: Flavia O, F, Valente, Susan C, Lindsey, Ji H, Yang, Priscila S, Signorini, Ariane C, Sarubo, Missaki Y, Sittoni e Maria Sharmila A, de Sousa,

Diagnóstico Molecular do Carcinoma Medular de Tiróide

Estas informações estão sendo fornecidas de maneira clara e simples para sua participação voluntária neste estudo, Portanto, leia este termo (4 páginas) com atenção e pergunte aos pesquisadores responsáveis sobre quaisquer dúvidas, sempre que considerar necessário, Após a leitura, caso concorde voluntariamente em participar, assine-o,

Este estudo tem por objetivo estudar os genes (material genético; DNA) envolvidos no carcinoma medular de tiróide em pacientes e familiares possivelmente afetados, além de correlacionar tais dados com os diferentes fenótipos (características clínicas) da doença,

A tiróide pode apresentar várias doenças e uma delas é o câncer de tiróide, Quando a tiróide é examinada (palpação) e apresenta alguma massa, nódulo ou aumento da glândula, há necessidade de uma ecografia da glândula (pescoço) e outros exames laboratoriais com finalidade diagnóstica,

Assim, é importante o exame de sangue, no qual o material genético (DNA) será examinado pelos pesquisadores do Ambulatório de Tiróide e Laboratório de Endocrinologia Molecular, na Disciplina de Endocrinologia (Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina), para a identificação de possíveis genes associados ao câncer de tiróide, No caso, o gene envolvido corresponde a uma proteína chamada RET, que, se alterada (apresentar mutações), pode levar ao desenvolvimento do carcinoma medular de tiróide (câncer de tiróide),

Para o exame, coletam-se 10 ml de sangue, obtido através de punção de veia do antebraço, A coleta de sangue é um procedimento de rotina e não apresenta riscos à saúde, Algumas vezes pode ocorrer o aparecimento de um pequeno hematoma no local da punção o que se resolve espontaneamente em alguns dias,

No caso de voluntários apresentarem material genético (DNA) com mutações, poderá ser sugerido um plano terapêutico, como a retirada cirúrgica da glândula tiróide, cirurgia esta que recebe o nome de tireoidectomia, Após a cirurgia é necessário fazer o acompanhamento para termos certeza de que a glândula afetada foi retirada e para evitar que a doença reapareça, Assim, são realizados diversos exames de sangue, urina e ultrassom do pescoço que vão nos mostrar se sobrou algum resto de tireoide afetada pela doença.

Dado que este tipo de carcinoma é transmitido de forma hereditária, no caso do material genético (DNA) de voluntários apresentar a mutação (câncer de tireoide), deverá ser revelado aos familiares o risco deles também apresentarem a mutação,

Não há benefício direto para o voluntário (e/ou familiares), Trata-se de um estudo experimental para verificar a presença de mutações no gene RET, as quais podem levar ao desenvolvimento de carcinoma medular de tireoide, e podem ser usadas como marcador para diagnóstico de tal forma de carcinoma, Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício,

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição,

Todas as informações obtidas sobre cada voluntário (e/ou seus familiares) para este estudo serão analisadas em conjunto e consideradas confidenciais, não sendo reveladas para outros, que não sejam os pesquisadores envolvidos, Dados que possam identificar o voluntário (e/ou seus familiares), como nome, serão mantidos em um arquivo separado das demais informações do estudo, O material biológico (sangue) e todas as demais informações sobre o voluntário (e/ou seus familiares) serão identificadas somente por números,

Apesar de todos os cuidados para manter a informação sobre o voluntário confidencial, existe o risco que informação perceptível (como o fato de o voluntário ter câncer, ou de ter risco de ter câncer ou outra doença) possa ser descoberto ou inferido por seus familiares, Da mesma forma o próprio voluntário pode descobrir ou inferir sobre dados de seus familiares,

É importante também ressaltar que os resultados e/ou informações (identificados somente por números) serão compartilhados com pesquisadores de outros centros colaboradores (no consórcio BRASMEN) para um melhor entendimento desta doença no Brasil,

O voluntário tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores, Não há despesas pessoais para o voluntário em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, Também não há compensação financeira relacionada à sua participação, Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa, Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o voluntário tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas,

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos pesquisadores responsáveis pelo estudo para esclarecimento de eventuais dúvidas, O investigador principal é Dr, Rui Monteiro de Barros Maciel, Professor Titular pela Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Medicina da UNIFESP – EPM, Todos os pesquisadores responsáveis pelo estudo podem ser encontrados nos endereços: Laboratório de Endocrinologia Molecular (R, Pedro de Toledo 669 - 11º andar), ou no Ambulatório de Tireoide (R, Borges Lagoa, 800) – telefone (11)5084-5231, Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br,

Comprometemo-nos em utilizar os dados, as amostras de sangue e os resultados obtidos somente para esta pesquisa, Todavia, há que se ressaltar que haverá estocagem de amostras de material biológico (sangue) e o pedido de permissão para o seu uso futuro deverá ser submetido e aprovado pelo CEP – UNIFESP,

Eu acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **Diagnóstico Molecular Ampliado do Carcinoma Medular de Tireoide**, Eu discuti com os pesquisadores responsáveis sobre a minha decisão em participar neste estudo, Ficaram claros para mim quais são os objetivos, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de armazenamento de dados e materiais biológicos, e de esclarecimentos permanentes sobre estudos futuros, Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário, Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço,

_____, RG, _____
Assinatura do voluntário / representante legal Data ____/____/____

_____, RG, _____
Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Para os casos de voluntários menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual,

(Somente para o responsável pelo estudo)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo,

_____, RG, _____
Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

ANEXO 6 – Autorização da editorai para publicação do artigo na dissertação

EJE

Clinical & translational endocrinology
from around the globe

 European Society
of Endocrinology
the European hormone society

HOME | ABOUT | ACCEPTED MSS | NEW ARTICLES | ARCHIVE | FREE REVIEWS | ALERTS | RSS  | SUBSCRIBE | SUBMIT | HELP | CONTACT

Requests to reproduce your own work

Bioscientifica grants to authors the right to reproduce their work free of charge in any publication of which they are the author or editor, subject only to giving proper credit in the work to the original publication by Bioscientifica.

Therefore, authors do not need to contact Bioscientifica to request permission to reproduce their work.

http://www.eje-online.org/site/misc/permissions_commercial_reprints.xhtml